

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA



**Propriedades anticancerígenas de um óleo essencial:
identificação de compostos e avaliação de actividades
biológicas**

André Filipe Couto Cardoso da Silva

Mestrado em Bioquímica
Especialização em Bioquímica

Dissertação orientada por:
Rita Pacheco
Maria Luísa Serralheiro

2017

Agradecimentos

Na realização deste trabalho, contei com algumas pessoas que me ajudaram tanto no trabalho em si e algumas que me ajudaram a passar os tempos menos bons deste caminho.

Por isso, desde já um muito obrigado!

Começo por agradecer às minhas orientadoras, a Professora Rita Pacheco e a Professora Maria Luísa Serralheiro, não só por me receberem no laboratório mesmo antes de começar esta jornada, mas também pelo apoio durante o trabalho, pelas ideias, disponibilidade, oportunidades que me deram e boa disposição durante todo este tempo.

Durante a elaboração desta dissertação, tive o privilégio de fazer parte do trabalho em Inglaterra, na De Montfort University em Leicester. Agradeço imenso às minhas orientadoras por me darem esta oportunidade.

Agradeço também ao Professor Parvez Haris por me receber de braços abertos, pela oportunidade, pela ajuda durante o tempo que estive em Leicester, pelo tempo que disponibilizou para discutir ideias e também por fornecer o óleo das sementes de *Nigella sativa*.

Durante todo o meu caminho académico tive um apoio enorme da minha família toda, principalmente da minha mãe, do meu irmão e da minha prima, por isso~, um muito obrigado à Dona Lurdes, ao Tiago e à Cátia por estarem aqui para me ajudar em tudo o que podiam.

Durante o meu tempo no laboratório conheci muita gente, e não posso deixar de dizer um muito obrigado.

Começo por agradecer à Elsa, ajudou-me em muito, dentro e fora do laboratório, com ela aprendi muito do que sei hoje em dia em termos do que é o trabalho laboratorial, para além disso, ajudou em momentos mais difíceis e na troca de ideias que sei que fizeram este trabalho melhor.

Queria agradecer também à Joana Peres, por ser das pessoas que me apoiou imenso até agora, principalmente no início do meu tempo no laboratório, à Laura, à Joana Henriques, à Ana, ao Camacho e ao Luís pelos bons momentos que passaram. Gostava também de agradecer à Joana Catarro, à Rebeca, à Violeta e ao Bruno por manterem o bom ambiente no laboratório neste último ano.

Durante o meu tempo em Leicester, tive um grande apoio do Filipe, que não só me ajudou a conhecer um bocado do que é a cidade, como partilhou o teto dele comigo e ainda foi uma companhia. Por tudo isso, muito obrigado.

Começando agora com os meus amigos de longa data, quero agradecer, ao Joaquim, à Débora e à Cátia, a família, que esteve sempre presente e sei que continuará a estar sempre que for necessário, nos bons e maus momentos.

Um muito obrigado ao pessoal do *Muy Nobre*. Foram tantos ao longo destes anos que não teria espaço para agradecer a todos, no entanto, um obrigado especial ao Miguel, ao Pedro, ao Alex, ao Brito, ao Puga, ao Rúben, ao Vítor, à Maëlle e ao Luís.

Por fim, agradeço ao pessoal do Porto e Açores, ao Nando, ao Joel, ao Fred, ao Daniel, ao Soares, ao André, ao Rocha e ao Bento. Obrigado pelos tempos bem passados.

Mais uma vez, obrigado a todos!

Resumo

Com o avanço na medicina, são também, cada vez mais procuradas soluções naturais contra as doenças, face ao receio que existe dos fármacos sintéticos.

O óleo de sementes de *Nigella sativa* é usado tradicionalmente sendo-lhe reconhecidas inúmeras propriedades e muitas atividades biológicas como antioxidante, anticancerígena, entre outras. Através da colaboração do Laboratório de Metabolismo de Compostos Fenólicos com o Professor Dr. Parvez Haris da De Montfort University, Reino Unido, surgiu o âmbito deste trabalho, o estudo do potencial deste óleo. Em trabalhos preliminares, notou-se que seria possível que as propriedades do óleo pudessem ser provenientes dos seus compostos voláteis. Como tal, foram identificados todos os compostos presentes no óleo e destes, os que foram removidos ao evaporar os voláteis e, posteriormente, realizados ensaios a diversas atividades biológicas para o óleo com e sem voláteis.

Foram identificados os seguintes compostos no óleo com voláteis: α -tujeno, α -pineno, sabineno, 3-careno, cimeno, γ -terpineno, hidrato de trans-sabineno, timoquinona, timol, α -longipineno, longifoleno, ácido palmítico, etil linoleato e metil linoleato, no entanto quando analisado o óleo sem voláteis foi notório que o α -tujeno, α -pineno, sabineno e 3-careno foram completamente removidos, a quantidade de cimeno e γ -terpineno encontrou-se muito diminuída e o hidrato de trans-sabineno e a timoquinona ligeiramente diminuídos, relativamente ao óleo com voláteis

Nos estudos de atividade antioxidante, verificou-se um EC_{50} de $6,74 \pm 0,57 \mu\text{g/mL}$ e $7,71 \pm 0,30 \mu\text{g/mL}$ para o óleo com voláteis e sem voláteis, respetivamente, o que significa que existiu uma pequena diminuição de atividade antioxidante com a remoção dos voláteis do óleo. Na peroxidação lipídica, foi determinado um EC_{50} de $51,77 \pm 5,17$ e $40,18 \pm 0,47 \mu\text{g/mL}$ para o óleo com e sem voláteis, respetivamente.

Num estudo preliminar acerca da inibição da atividade da 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A redutase (HMGCR), a concentração de $5,56 \mu\text{g/mL}$ apresenta cerca de 90% de inibição para o óleo com voláteis e cerca de 16% para o óleo sem voláteis. No estudo da inibição da atividade da acetilcolinesterase (AChE), obteve-se um IC_{50} de $0,1782 \pm 0,0206 \mu\text{g/mL}$ para o óleo com voláteis e o óleo sem voláteis não apresentou qualquer tipo de inibição.

Quanto aos testes de citotoxicidade contra linhas celulares do cancro da mama (MCF-7) e do melanoma (A375), o óleo com voláteis apresentou um LC_{50} de $1,64 \pm 0,38 \mu\text{g/mL}$ e $1,28 \pm 0,08 \mu\text{g/mL}$, respetivamente. O óleo sem voláteis, para ambas as linhas celulares, não apresentou qualquer tipo de atividade citotóxica, no caso da linha celular MCF-7, o óleo pareceu, em oposição, potenciar o crescimento das mesmas. Com esta análise, foi possível verificar que o método de remoção dos voláteis do óleo resultou, na maioria dos casos, numa perda das atividades biológicas associadas ao óleo com voláteis, o que indica que a maior parte das atividades estudadas é proveniente dos compostos mais voláteis do óleo.

Foi estudado também o perfil proteico da linha celular A375 em contacto com o óleo com voláteis por PAGE-nativa verificando-se um aumento da expressão de duas proteínas, a POTE anquirina, membro da família de domínio F, que é frequentemente associada à apoptose, e a HSP 90- β , que é sobre-expressa quando ocorre stresse celular. Deste modo pode-se propor que as células A375 foram eliminadas por apoptose e sujeitas a stresse celular quando em contacto com o óleo o que justifica a sua elevada citotoxicidade.

Estudou-se ainda, através de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier acoplada a refletância total atenuada (FTIR-ATR), as alterações na estrutura de duas proteínas modelo, a albumina do soro bovino (BSA) e lisozima (Lys), em contacto com o óleo com voláteis, e foi verificado que a

BSA não sofreu alterações nos ensaios realizados, no entanto, os compostos voláteis mostram ter uma capacidade de proteger a estrutura secundária da Lys, o que pode levar à prevenção da agregação desta. Em conclusão, este inovador estudo sobre o óleo da *Nigella nativa* revelou-se de extrema importância para identificar os compostos no óleo que poderão estar associados às propriedades biológicas exibidas, complementando estudos anteriores, e para perceber as modificações sobre as proteínas das linhas celulares humanas em contacto com o óleo que poderão justificar algumas das suas bioatividades.

Palavras chave: *Nigella sativa*, óleo, voláteis, bioatividade, perfil proteico.

Abstract

With the advance of medicine, natural pharmaceuticals are becoming more popular with the growing fear of the synthetic drugs.

The oil from the seeds of *Nigella sativa* is traditionally used and has a lot of proprieties and biological activities like antioxidant, anticancer, among others. Through the collaboration of the Laboratório de Metabolismo de Compostos Fenólicos with Professor Dr. Parvez Haris of De Montfort University, United Kingdom, the theme of this work emerged, the study of the potential of this oil. In preliminary work, it was noticed that the properties of the oil might be coming from the volatile compounds. As such, all the compounds of the oil were identified and from these, the ones that were removed with the evaporation of the volatiles and then, studies of different biological activities were made to the oil with and without the volatiles.

The following compounds were identified in the oil with volatiles: α -thujene, α -pinene, sabinene, 3-carene, cymene, γ -terpinene, trans-sabinenehydrate, thymoquinone, thymol, α -longipinene, longifolene, palmitic acid, ethyl linoleate and methyl linoleate, however, when studying the oil without the volatiles, α -thujene, α -pinene, sabinene and 3-carene were completely removed, cymene and γ -terpinene were present in a very small quantity and trans-sabinenehydrate and thymoquinone were just slightly below the oil with volatiles.

In the antioxidant studies, the EC_{50} was $6,74 \pm 0,57 \mu\text{g/mL}$ and $7,71 \pm 0,30 \mu\text{g/mL}$ to the oil with a and without the volatiles, respectively, which means that there is a small loss of activity with the removal of the volatiles. To the lipid peroxidation, the EC_{50} was $51,77 \pm 5,17$ and $40,18 \pm 0,47 \mu\text{g/mL}$ to the oil with volatiles and without volatiles, respectively.

In a preliminary study about the inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase (HMGCR), a concentration of $5,56 \mu\text{g/mL}$ shows approximately 90% of inhibition to the oil with volatiles and about 16% to the oil without volatiles. In the study of the inhibition of acetylcholinesterase (AChE), the IC_{50} was $0,1782 \pm 0,0206 \mu\text{g/mL}$ to the oil with volatiles and the oil without volatiles showed no inhibitory activity.

The cytotoxicity tests against cell lines from breast cancer (MCF-7) and melanoma (A375), the oil with volatiles showed a LC_{50} of $1,64 \pm 0,38 \mu\text{g/mL}$ and $1,28 \pm 0,08 \mu\text{g/mL}$, respectively. The oil without the volatiles didn't show any cytotoxic activity to both cell lines, in the case of MCF-7 it even seemed to potentiate its growth. With this analysis, it can be noticed that the method to remove the volatiles from the oil resulted, on most cases, in a loss of biological activities associated with the oil with volatiles, this shows that most of the biological activities comes from the more volatile compounds of the oil.

It was also studied the protein profile of the A375 cell line in contact with the oil with volatiles with native-PAGE and an increase of the expression of two proteins was verified, the POTE ankyrin domain family member F, which is associated with apoptosis and the HSP 90- β , which is overexpressed when the cell is in stress. Knowing this, it can be proposed that the A375 cells, in contact with the oil are being eliminated through apoptosis and are subject to cellular stress when in contact with the oil which can justify the high cytotoxicity.

It was also studied, through Fourier transform infrared spectroscopy coupled with attenuated total reflectance (FTIR-ATR), the alterations in the structure of two model proteins, the bovine serum albumin (BSA) and lysozyme (Lys), in contact with the oil with volatiles and it was noticed that BSA didn't suffer alterations in the studies made, although, the volatile compounds showed a capacity to protect the secondary structure of Lys which can prevent its aggregation.

Concluding, this innovative study of the oil from the seeds of *Nigella sativa* was of extreme importance to identify the compounds in the oil that could be associated to the biological activities, complementing

previous studies, and to understand the alterations of the proteins in human cell lines in contact with the oil, that can justify the bioactivity.

Keywords: *Nigella sativa*, oil, volatiles, bioactivity, protein profile.

Índice

1	Introdução.....	1
1.1	Problemática.....	2
1.2	Plantas na medicina.....	2
1.3	<i>Nigella sativa</i>	3
1.3.1	Composição química.....	3
1.3.2	Timoquinona, o composto ativo da <i>Nigella sativa</i>	4
1.3.3	Potencial farmacológico.....	5
1.3.3.1	Atividade antioxidante.....	5
1.3.3.2	Inibição da atividade da HMGCR.....	7
1.3.3.3	Inibição da atividade da acetilcolinesterase (AChE).....	8
1.3.3.4	Atividade anticancerígena.....	10
2	Objetivos.....	13
3	Procedimento Experimental.....	15
3.1	Materiais.....	16
3.1.1	Óleo.....	16
3.1.2	Linhas celulares.....	16
3.2	Métodos.....	16
3.2.1	Determinação da densidade do óleo.....	16
3.2.2	Preparação das amostras de óleo sem voláteis.....	17
3.2.3	Análise de cromatografia gasosa e identificação de compostos.....	17
3.2.4	Quantificação de fenóis totais.....	18
3.2.5	Atividade antioxidante.....	19
3.2.6	Inibição da peroxidação lipídica.....	20
3.2.7	Inibição da atividade da HMGCR.....	21
3.2.8	Inibição da atividade da AChE.....	22
3.2.9	Citotoxicidade do óleo para as linhas celulares MCF-7 e A375.....	23
3.2.9.1	Crescimento celular.....	23
3.2.9.2	Ensaio de viabilidade celular.....	23
3.2.10	Estudo de perfil proteico da linha celular A375.....	25
3.2.10.1	Preparação celular.....	25
3.2.10.2	Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições nativas (PAGE-nativa).....	25
3.2.11	Análise de Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).....	26
4	Resultados e Discussão.....	27
4.1	Identificação de compostos por GC-MS.....	28

4.1.1	Injeção <i>split</i>	28
4.1.2	SPME.....	31
4.2	Quantificação de fenóis totais	33
4.3	Atividade Antioxidante	34
4.4	Inibição da peroxidação lipídica.....	35
4.5	Inibição da atividade da HMGCR	36
4.6	Inibição da atividade da AChE.....	37
4.7	Citotoxicidade em células cancerígenas.....	38
4.7.1	Células do cancro da mama (MCF-7)	38
4.7.2	Células do melanoma (A375).....	40
4.8	Estudo do perfil proteico (A375).....	42
4.9	Estudo da estrutura proteica em contacto com os voláteis do óleo através de FTIR.....	44
5	Conclusões e Perspetivas Futuras.....	53
5.1	Conclusões.....	54
5.2	Perspetivas Futuras.....	55
6	Bibliografia.....	57
7	Anexos.....	65

Índice de figuras

Figura 1.1 - <i>Nigella sativa</i> e as respetivas sementes. ¹⁰	3
Figura 1.2 - Estrutura molecular de alguns compostos químicos identificados nas sementes de <i>Nigella sativa</i> .	4
Figura 1.3 - Esquema da peroxidação lipídica. Adaptado de ³⁰	6
Figura 1.4 - Via do mevalonato (esquerda) e reação catalisada pela HMGCR. Adaptado de ³⁸	7
Figura 1.5 - Esquema da fenda sináptica com o ciclo da ACh. Adaptado de ⁴⁵	9
Figura 3.1 - Reação de redução que ocorre no método colorimétrico do DPPH, o radical DPPH [•] é reduzido na presença de um agente antioxidante AH. ⁶⁷	19
Figura 3.2 - Reação que ocorre no método do TBARS. ⁶⁸	20
Figura 3.3 - Reação que ocorre no <i>kit</i> de determinação da atividade da HMGCR	21
Figura 3.4 - Reação que ocorre na quantificação da atividade da AChE. ⁶⁷	22
Figura 3.5 - Reação que ocorre no método colorimétrico de viabilidade celular, MTT. ⁷⁰	24
Figura 4.1 - Cromatograma do óleo com voláteis obtido por GC-MS de acordo com a metodologia descrita em 3.2.2 com injeção <i>split</i> .	28
Figura 4.2 - Cromatograma do óleo sem voláteis obtido por GC-MS de acordo com a metodologia descrita em 3.2.2 com injeção <i>split</i> .	29
Figura 4.3 - Cromatograma do óleo com voláteis obtido por GC-MS de acordo com a metodologia descrita em 3.2.2 através de SPME.	31
Figura 4.4 - Cromatograma do óleo sem voláteis obtido por GC-MS de acordo com a metodologia descrita em 3.2.2 através de SPME.	31
Figura 4.5 - Quantificação de fenóis totais para o óleo com e sem voláteis	33
Figura 4.6 - Atividade antioxidante das diferentes concentrações de óleo com e sem voláteis, determinada de acordo com o procedimento descrito em 3.2.5.	34
Figura 4.7 - Inibição da peroxidação lipídica das diferentes concentrações de óleo com e sem voláteis, determinada de acordo com o procedimento descrito em 3.2.6.	35
Figura 4.8 - Inibição da atividade da HMGCR para as diferentes concentrações de óleo com voláteis.	36
Figura 4.9 - Inibição da atividade da HMGCR para as diferentes concentrações de óleo sem voláteis.	36
Figura 4.10 - Inibição da atividade da AChE para o óleo com e sem voláteis	37
Figura 4.11 - Morte celular (%) da linha celular MCF-7 para diferentes concentrações de óleo com voláteis.	39
Figura 4.12 - Morte celular (%) da linha celular MCF-7 para diferentes concentrações de óleo sem voláteis.	39
Figura 4.13 - Morte celular (%) da linha celular A375 para diferentes concentrações de óleo com voláteis.	40
Figura 4.14 - Morte celular (%) da linha celular A375 para diferentes concentrações de óleo sem voláteis.	40
Figura 4.15 - Eletroforese PAGE nativa (7,5%); O – Proteínas da cultura celular A375 (30 µg) em contacto com a LC ₅₀ do óleo durante 24 h; C – Proteínas da cultura celular controlo A375 (30 µg); M – Marcador de peso molecular NZYTech® Blue Protein Marker.	42
Figura 4.16 - Gráfico da média do <i>gray value</i> vs migração correspondente ao gel apresentado na Figura 4.15.	43
Figura 4.17 - Resultados da identificação das proteínas.	43

Figura 4.18 - Espectro de FTIR entre 4000 e 1000 cm^{-1} das amostras da linha celular A375 controlo e em contacto com o óleo, obtida como descrito em 3.2.10.1.	45
Figura 4.19 - Espectros de FTIR entre 1800 e 1400 cm^{-1} de BSA sob agitação (BSA+A 0 h) e BSA em contacto com o óleo sob agitação (BSA+OA 0 h), como descrito em 3.2.11.	46
Figura 4.20 - Espectros de FTIR entre 1800 e 1400 cm^{-1} de Lys sob agitação (Lys+A 0 h) e Lys em contacto com o óleo e sob agitação (Lys+OA 0 h), como descrito em 3.2.11.	46
Figura 4.21 - Espectros de FTIR entre 1800 e 1400 cm^{-1} de BSA sob agitação durante 72 h (BSA+A 72 h) e BSA em contacto com o óleo e sob agitação durante 72 h (BSA+OA 72 h), como descrito em 3.2.11.	47
Figura 4.22 - Espectros de FTIR entre 1800 e 1400 cm^{-1} de Lys sob agitação durante 72 h (Lys+A 72 h) e Lys em contacto com o óleo e sob agitação durante 72 h (Lys+OA 72 h), como descrito em 3.2.11.	47
Figura 4.23 - Espectros de FTIR entre 1800 e 1400 cm^{-1} de BSA a 37 °C durante 24 h (BSA+T 24 h) e BSA em contacto com os voláteis a 37 °C durante 24 h (BSA+VT 24 h), como descrito em 3.2.11.	48
Figura 4.24 - Espectros de FTIR entre 1800 e 1400 cm^{-1} de Lys a 37 °C durante 24 h (Lys+T 24 h) e Lys em contacto com os voláteis a 37 °C durante 24 h (Lys+VT 24 h), como descrito em 3.2.11.	48
Figura 4.25 - Espectros de FTIR entre 1800 e 1400 cm^{-1} de BSA a 37 °C durante 72 h (BSA+T 72 h) e BSA em contacto com os voláteis a 37 °C durante 72 h (BSA+VT 72 h), como descrito em 3.2.11.	49
Figura 4.26 - Espectros de FTIR entre 1800 e 1400 cm^{-1} de Lys a 37 °C durante 72 h (Lys+T 72 h) e Lys em contacto com os voláteis a 37 °C durante 72 h (Lys+VT 72 h), como descrito em 3.2.11.	49
Figura 4.27 - Rácios 1622/1651 de todos os espectros apresentados. a) corresponde aos rácios dos espectros que estiveram sob agitação 0 h e 72 h, tanto da proteína em contacto com o óleo (BSA+OA e Lys+OA) bem como dos respetivos controlos (BSA+A e Lys+A). b) corresponde aos rácios dos espectros que estiveram sob temperatura 24 h e 72 h, tanto da proteína em contacto com os voláteis (BSA+VT e Lys+VT) bem como dos respetivos controlos (BSA+T e Lys+T). C_B e C_L correspondem ao rácio da proteína com a sua estrutura nativa da BSA e Lys, respetivamente.	50
Figura 7.1 - α -tujeno (ID 1).	66
Figura 7.2 - α -pineno (ID 2).	67
Figura 7.3 - sabineno (ID 3).	68
Figura 7.4 - 3-careno (ID 4).	69
Figura 7.5 - cimeno (orto/para) (ID 5).	70
Figura 7.6 - γ -terpineno (ID 6).	71
Figura 7.7 - hidrato de trans-sabineno (ID 7).	72
Figura 7.8 - timoquinona (ID 8).	73
Figura 7.9 - timol (ID 9).	74
Figura 7.10 - α -longipineno (ID 10).	75
Figura 7.11 - longifoleno (ID 11).	76
Figura 7.12 - ácido palmítico (ID 12).	77
Figura 7.13 - Composto não identificado (n.i.) (ID 13).	78
Figura 7.14 - etil linoleato e metil linoleato (ID 14).	79

Índice de tabelas

Tabela 3.1 - Pesagem do óleo para a determinação da densidade	16
Tabela 3.2 - Condições da corrida cromatográfica do ensaio de atividade da HMGCR	21
Tabela 4.1 - Identificações dos picos numerados nos cromatogramas do óleo com e sem voláteis (Figura 4.1 e Figura 4.2, respetivamente) de acordo com os espetros de massa (Anexo A), bem como a comparação entre ambos (n.i. – não identificado).....	29
Tabela 4.2 - Identificações dos picos numerados nos cromatogramas do óleo com e sem voláteis através de SPME (Figura 4.3 e Figura 4.4, respetivamente) de acordo com os espetros de massa (Anexo A), bem como a comparação entre ambos.....	32

Abreviaturas

ACh – Acetilcolina, do inglês *Acetylcholine*

AChE – Acetilcolinesterase, do inglês *Acetylcholinesterase*

AChI – Iodeto de acetiltiocolina, do inglês *Acetylthiocholine iodide*

AD – Doença de Alzheimer, do inglês *Alzheimer's Disease*

ATP – Trifosfato de Adenosina

ATR – Refletância total atenuada, do inglês *Attenuated Total Reflectance*

BHT – Butil hidrotolueno

BSA – Albumina do soro bovino, do inglês *Bovine Serum Albumin*

CoASH – Coenzima A

DAD – Detetor de arranjo de díodos, do inglês *Diode Array Detector*

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DPPH – Radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil

EC₅₀ – Concentração eficiente necessária para 50% da extinção do radical DPPH, do inglês *Efficient Concentration*

FTIR – Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier, do inglês *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*

GAE – Equivalentes de ácido gálico, do inglês *Gallic Acid Equivalents*

GC – Cromatografia gasosa, do inglês *Gas chromatography*

HDL-C – Colesterol nas lipoproteínas de alta densidade, do inglês *High Density Lipoprotein Cholesterol*

HMG-CoA – 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A

HMGCR – 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A redutase

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*

IC₅₀ – Concentração inibitória necessária para 50% de inibição, do inglês *Inhibitory Concentration*

LC₅₀ – Concentração letal necessária para 50% de morte, do inglês, *Lethal Concentration*

LDL-C – Colesterol nas lipoproteínas de baixa densidade, do inglês *Low Density Lipoprotein Cholesterol*

Lys – Lisozima, do inglês *Lysozyme*

MDA – Malondialdeído

MS – Espectrometria de massa, do inglês *Mass Spectrometry*

MTT – Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio

NADPH – Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina, do inglês *Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate*

PBS – Tampão de fosfatos salina, do inglês *Phosphate-Buffered saline*

SPME – do inglês *Solid-phase Microextraction*

TBA – Ácido tiobarbitúrico do inglês *Thiobarbituric Acid*

TBARS – Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, do inglês *Thiobarbituric Acid Reactive Substances*

t-BHP – t-butil hidroperóxido

TCA – Ácido tricloroacético, do inglês *Trichloroacetic Acid*

1 Introdução

1.1 Problemática

Com a colaboração entre o Laboratório de Metabolismo de Compostos Fenólicos e o Professor Dr. Parvez Haris da De Montfort University, Reino Unido, e com base no que se sabe acerca das potencialidades da *Nigella sativa*, decidi estudar-se algumas das propriedades biológicas do óleo extraído das sementes da planta. Este óleo, designado frequentemente por óleo de cominho preto, é muito utilizado no médio oriente e na Índia na medicina tradicional, e as sementes são também utilizadas como medicinais ou como ingrediente na alimentação.

Testes preliminares mostraram que, potencialmente, o óleo seria altamente tóxico contra as células cancerígenas em estudos *in vitro*. Notou-se também que muita desta atividade poderia vir dos compostos mais voláteis do óleo, uma vez que mesmo as células que não estavam em contacto direto com o óleo e apenas com os vapores libertados, apresentavam uma percentagem de morte muito elevada.

No presente trabalho, decidiu-se aprofundar algumas das atividades biológicas do óleo de *Nigella sativa*, nomeadamente as capacidades antioxidantes, anticancerígenas e ainda tentar compreender se ocorreriam alterações a nível proteico de células em contacto com o óleo das sementes da planta. Os ensaios foram realizados utilizando o óleo (com todos os compostos) e, paralelamente, com o óleo sem voláteis (óleo ao qual foram retirados os compostos mais voláteis).

1.2 Plantas na medicina

Ao longo dos anos, a humanidade tem utilizado a natureza para as suas necessidades básicas. Uma destas utilizações é a saúde, onde normalmente se utilizam plantas para prevenir, ou tratar doenças. Estas práticas, no entanto, começaram por ser instintivas, sendo que vêm evoluindo, e ainda nos dias de hoje são utilizadas plantas em diferentes terapêuticas e tratamentos. Apesar da utilização destas poder ser associada a crenças, culturas e teorias, há plantas que, nos dias de hoje, revelam ter atividade nos tratamentos para os quais têm sido utilizadas há milhares de anos.¹⁻⁵

Com o avanço da medicina e da indústria farmacêutica, a utilização de plantas e fitoquímicos bioativos no tratamento de patologias sofreu algum decréscimo. A síntese química na indústria farmacêutica surgiu como alternativa à extração dos compostos derivados de plantas porque as suas atividades poderiam depender de fatores como o método de extração, a cultura e ainda de vários componentes biológicos como gorduras, proteínas, água, entre outros.⁶ No entanto, a indústria farmacêutica evoluiu muito devido às medicinas tradicionais, uma vez que para a síntese de novos compostos, muitas vezes são utilizadas moléculas de origem vegetal como base, sendo depois modificadas para formular o fármaco final.¹

Para além disso, a procura de fármacos alternativos seguros e naturais tem aumentado como consequência da preocupação dos consumidores acerca da toxicidade de químicos sintéticos e o conhecimento dos usos das plantas pelos povos pode ser considerado um fator para descobrir novos compostos terapêuticos.^{7,8} Posto isto, o desenvolvimento de fármacos baseado em conceitos de medicinas tradicionais tem sido cada vez mais aceite no sistema médico dos dias de hoje.⁹

1.3 *Nigella sativa*

A *Nigella sativa* (**Figura 1.1**) é uma planta anual que pertence à família *Ranunculaceae* e cresce majoritariamente no sul da Europa e em algumas partes da Ásia, como a Síria, Turquia, Arábia Saudita, Paquistão e Índia. Os frutos desta planta são cápsulas que contêm inúmeras sementes pretas no seu interior, daí surge o nome pelo qual as sementes são principalmente conhecidas, como sementes de cominhos pretos, do inglês *black cumin seed* (ou apenas *black seed* e *black cumin*).¹⁰⁻¹² O cultivo desta planta remonta a mais de 3000 anos ao império Assírio e Egípcio.⁴

As sementes, bem como o óleo que destas é extraído, são utilizados na gastronomia e na medicina tradicional em muitos países incluindo a Índia, Egito e Síria, entre outros. São utilizadas para preparação de doces tradicionais, compostos por uma pasta de sementes de *Nigella sativa* misturada com mel, e na preparação de pastelaria. São também utilizadas como especiarias e, principalmente, produtos de padaria e queijos.¹²

Para além da gastronomia, as sementes e o óleo são também muito utilizadas desde os tempos mais antigos na medicina popular para o tratamento de uma grande gama de doenças como a diabetes, hipertensão, febre, artrites, inflamações, distúrbios gastrointestinais e cancro. Para além da sua utilização na medicina tradicional, o óleo de *Nigella sativa* tem vindo a ser estudado comprovando várias funções farmacológicas, sendo que uma grande variedade de benefícios tem sido comprovada experimentalmente.^{10,11,13}



Figura 1.1 - *Nigella sativa* e as respetivas sementes.¹⁰

1.3.1 Composição química

Apesar de plantas da mesma espécie apresentarem diferentes composições químicas, vários compostos químicos já foram extraídos, identificados e quantificados na *Nigella sativa* bem como nas suas sementes. As sementes contêm cerca de 406 g de gordura, 216 g de proteína, 84 g de fibra, 45 g de cinza e 249 g de hidratos de carbono por cada quilograma. Nas sementes da planta foi identificada a presença de vários compostos químicos (**Figura 1.2**) como timoquinona (a), *p*-cimeno (b), timol (c) e α -pineno (d).^{10,12}

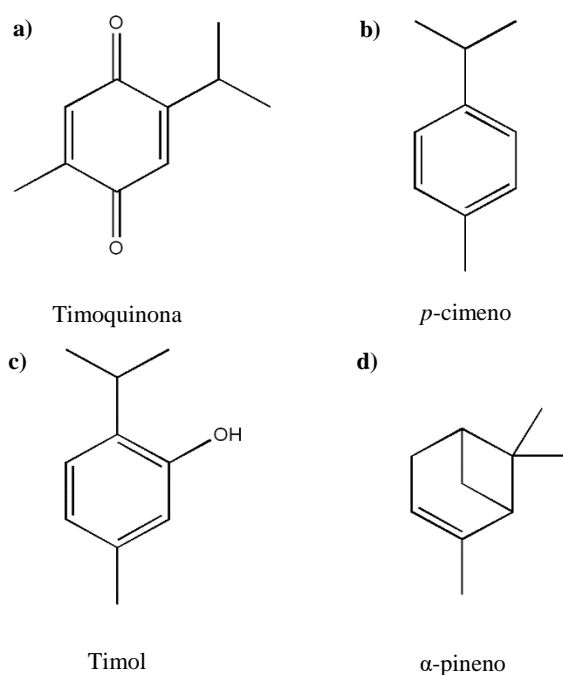


Figura 1.2 - Estrutura molecular de alguns compostos químicos identificados nas sementes de *Nigella sativa*.

Nas sementes de *N. sativa* foram também identificadas, através de estudos fitoquímicos, duas classes de alcaloides, alcaloides de isoquinolina, como o N-óxido de nigelimina, e alcaloides de pirazole, como a nigelidina e a nigelicina. São ricas em ácidos gordos insaturados como o ácido linoleico, ácido oleico e ácido palmítico. Há ainda outros compostos presentes nas sementes de *N. sativa* como saponinas, flavonoides, algumas vitaminas e minerais como cálcio, fósforo, cobre, zinco e ferro.^{10,11}

1.3.2 Timoquinona, o composto ativo da *Nigella sativa*

A timoquinona, 2-isopropil-5-metil-1,4-benzoquinona (**Figura 1.2, a**), é um dos compostos presentes na *N. sativa*, sendo este também um dos que está em maior quantidade e, ao qual estão atribuídos os principais efeitos biológicos da planta, sementes e óleo. São muitas as atividades farmacológicas que estão associadas a este composto, atividades como a capacidade antioxidante, anti-inflamatória, efeitos hepatoprotetores, hipolipidêmicos, hipotensivos e anticancerígenos.¹⁴⁻¹⁶

Este composto tem vindo a ser muito estudado ao longo dos anos e tem mostrado atividade anticancerígena tanto *in vitro* como *in vivo*.^{17,18} Apesar disto, existem barreiras que limitam a utilização da timoquinona como um possível candidato a testes clínicos no tratamento do cancro. Uma destas limitações é a sua toxicidade. Estudos preliminares da timoquinona em ratos mostram que a dose máxima tolerada é menor em ratos femininos em comparação com os masculinos.¹⁷

Outra limitação da timoquinona é a sua baixa biodisponibilidade, muito devido à sua natureza lipofílica, que pode também causar limitações numa possível formulação farmacêutica. Para ultrapassar este problema já foi testada a utilização de nanopartículas, bem como de lipossomas e, em ambos os casos, a timoquinona apresentou uma maior atividade quando administrada em nanopartículas e lipossomas, em comparação com o composto livre. Os testes foram também feitos em duas linhas celulares do cancro da mama diferentes MDA-MB-231 (ATCC® HTB-26™) no estudo das nanopartículas e MCF-7 (ATCC® HTB-22™) no estudo dos lipossomas.^{17,19,20}

Existe também o estudo da administração de timoquinona em pacientes com cancro em estado avançado, no entanto, não houve qualquer tipo de resultado conclusivo, tanto ao nível de toxicidade, bem como na resposta terapêutica.²¹

1.3.3 Potencial farmacológico

A utilização do óleo das sementes de *N. sativa* origina dos antigos Egípcios, Gregos e Romanos, sendo esta referida pelo profeta Islâmico, Mohammed, como tendo o poder de curar todas as doenças exceto a morte.¹⁴ Para além das crenças que estão relacionadas com esta planta, à *Nigella sativa* e ao seu principal composto ativo, a timoquinona, foram atribuídas várias atividades farmacológicas. Algumas das atividades associadas são efeitos protetores a nível cardiovascular, gástrico, nefrótico, hepático, imunitário e de sistema nervoso.^{10,11} Para além disso, o óleo das sementes de *N. sativa* é reportado como tendo capacidade antioxidante, anticancerígena e ainda capacidade inibitória de enzimas como a acetilcolinesterase (AChE) (EC 3.1.1.7) e HMG-CoA redutase (HMGCR) (EC 1.1.1.88), que são enzimas diretamente relacionadas a doenças como o Alzheimer e cardiovasculares, respetivamente.²²⁻²⁵

1.3.3.1 Atividade antioxidante

As espécies reativas de oxigénio (ROS) são moléculas que são produzidas constantemente nas células durante o seu normal metabolismo do oxigénio, como por exemplo o radical superóxido (O_2^\cdot), o peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e o radical hidroxilo (HO^\cdot) e ainda as espécies de azoto reativo como o óxido nítrico (NO^\cdot), que reage com o radical superóxido para formar peroxinitrito, que tem um papel muito importante na peroxidação lipídica. Se o nível de ROS for elevado, pode resultar em danos nas estruturas celulares ou até mesmo morte celular. Este processo é conhecido como stresse oxidativo, que ocorre quando há uma produção muito elevada de ROS e/ou quando não são eliminadas pelos processos antioxidativos. Os processos antioxidativos podem ser enzimáticos ou não enzimáticos. Nos enzimáticos existem enzimas como a superóxido dismutase (SOD), a catalase ou a glutathione peroxidase que destroem ou inibem a formação de ROS. Nos processos não-enzimáticos, existem moléculas (frequentemente designadas por antioxidantes) que impedem o stresse oxidativo, como o ácido ascórbico ou o β -caroteno por captação dos radicais livres, impedindo que estes reajam.^{22,26,27}

Um stresse oxidativo muito elevado pode resultar em danos nos lípidos, como a peroxidação lipídica (**Figura 1.3**), danificando as membranas celulares, nas proteínas, e ainda podendo danificar os ácidos nucleicos, como o DNA. Portanto, manter um equilíbrio entre os sistemas oxidante e antioxidante é vital para o bom funcionamento celular.²⁶

O óleo das sementes de *N. sativa* apresenta, em vários estudos, capacidade antioxidante de captação de radicais. A atividade antioxidante do óleo de sementes de diferentes regiões da Turquia foi verificada em testes *in vitro* pelo método colorimétrico do DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo), onde se utiliza o radical DPPH de coloração violeta e que muda de cor após o radical ser captado.²⁸ Para além das sementes de *Nigella sativa*, existem outras partes da planta, como os rebentos e as raízes, que também foram reportadas como apresentando atividade antioxidante. Os extratos metanólicos de cada uma das partes da planta, sementes, rebentos e raízes, apresentaram atividade antioxidante, tanto através de métodos colorimétricos do DPPH *in vitro*, como métodos celulares, onde é feita a incubação com compostos que induzem o stresse oxidativo em células, como o t-butil hidroperóxido (t-BHP), cuja oxidação é quantificada com diacetato de 2',7'-diclorofluorescina que consegue permear a membrana celular e se torna fluorescente.²⁹

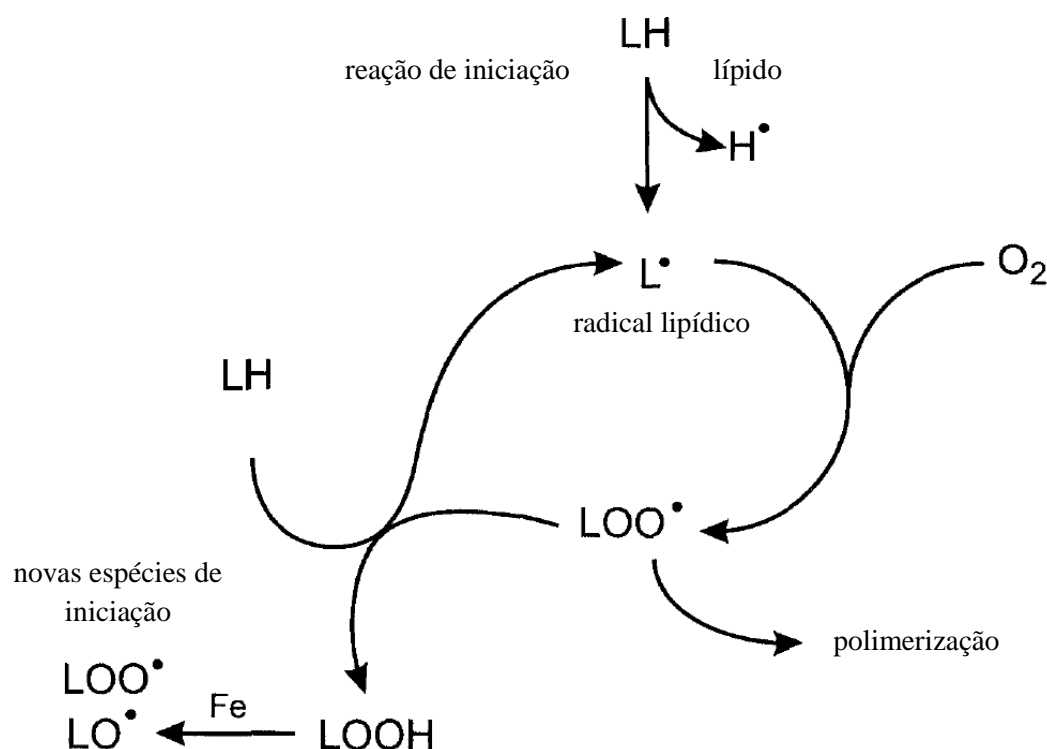


Figura 1.3 - Esquema da peroxidação lipídica. Adaptado de ³⁰.

A produção exagerada de ROS pode também acontecer quando na presença de compostos quimioterapêuticos, como a cisplatina. Estes compostos, para além de aumentarem o nível de ROS, diminuem também a quantidade de antioxidantes intracelulares, que se pode refletir na falha dos mecanismos de defesa antioxidante contra os danos oxidativos.³¹

A utilização de compostos antioxidantes em associação com os quimioterapêuticos é uma das opções para reduzir estes danos. Num estudo de tecido hepático de ratos em contacto com a cisplatina, o óleo das sementes de *N. sativa* foi utilizado juntamente com o composto quimioterapêutico, e, tanto a peroxidação lipídica como a fragmentação do DNA, foi reduzida em comparação aos níveis de quando é apenas utilizada cisplatina.³¹

A timoquinona também foi reportada como antioxidante, portanto a sua presença e de outros compostos poderá estar associada a esta propriedade do óleo de sementes de *N. sativa*.^{10,11,31}

Comercialmente, o hidroxitolueno butilado (BHT) é um aditivo sintético lipofílico muito utilizado, tanto na cosmética como nos alimentos, como antioxidante. Apesar de este parecer seguro em baixas concentrações, em doses mais elevadas é suspeito de poder provocar danos renais e hepáticos e cancro, por isso, é urgente encontrar alternativas.³² Durante as últimas décadas têm surgido vários estudos sobre o uso de produtos naturais de plantas com atividade antioxidante como alternativa para reduzir a aplicação destes compostos sintéticos, devido não apenas aos efeitos negativos sobre a saúde, mas também em resultado da exigência do consumidor por produtos naturais.^{33,34}

1.3.3.2 Inibição da atividade da HMGCR

A World Health Organization (WHO) declarou que as doenças cardiovasculares podem ser responsáveis por aproximadamente 23,6 milhões de mortes em todo o mundo no ano de 2030, um aumento de cerca de 55 % em relação aos números presentes no relatório de 2003, onde a WHO atribuiu à doença cardiovascular, um terço de todas as mortes mundiais, que ronda os 15,3 milhões. Segundo a WHO, o consumo de dietas pouco saudáveis, ricas em gorduras, sal e açúcares e pobres em hidratos de carbono complexos, frutas e vegetais têm uma grande responsabilidade no aparecimento de doenças cardiovasculares.^{24,35} Um fator importante para o elevado risco deste tipo de doenças é a aterosclerose, ou seja, o depósito de placas de gordura/lípidos/colesterol e cálcio no interior das artérias que dificultam a circulação sanguínea nos órgãos e podem mesmo chegar a impedi-la.

Neste momento, já é conhecimento comum, que os indivíduos com hipercolesterolemia têm uma maior probabilidade de sofrer um ataque cardíaco ou um acidente vascular cerebral do que as pessoas com níveis de lípidos dentro dos limites. Visto que estas doenças são a principal causa de muitas das mortes em todo o mundo, é importante encontrar maneiras de controlar o seu aparecimento.

O colesterol presente no organismo é proveniente da dieta e da síntese endógena. Na via metabólica de síntese do colesterol, a HMGCR é uma enzima chave do principal ponto de regulação desta via, por isso, inibindo a sua atividade pode ser uma maneira de controlar os níveis de colesterol no sangue.^{24,36,37}

O colesterol é um dos produtos da via do mevalonato, esta via utiliza acetil-coenzima A, juntamente com NADPH e ATP, para produzir esteróis e isoprenoides, onde um dos esteróis é o colesterol. Num dos passos desta via há a redução de HMG-CoA para Coenzima A (CoASH) e mevalonato. Este passo da via é catalisado pela enzima HMGCR, portanto, a inibição desta reação irá, consequentemente, inibir alguma da produção de colesterol. A via do mevalonato, bem como a reação catalisada pela HMGCR estão esquematizadas na **Figura 1.4**.³⁶⁻³⁸

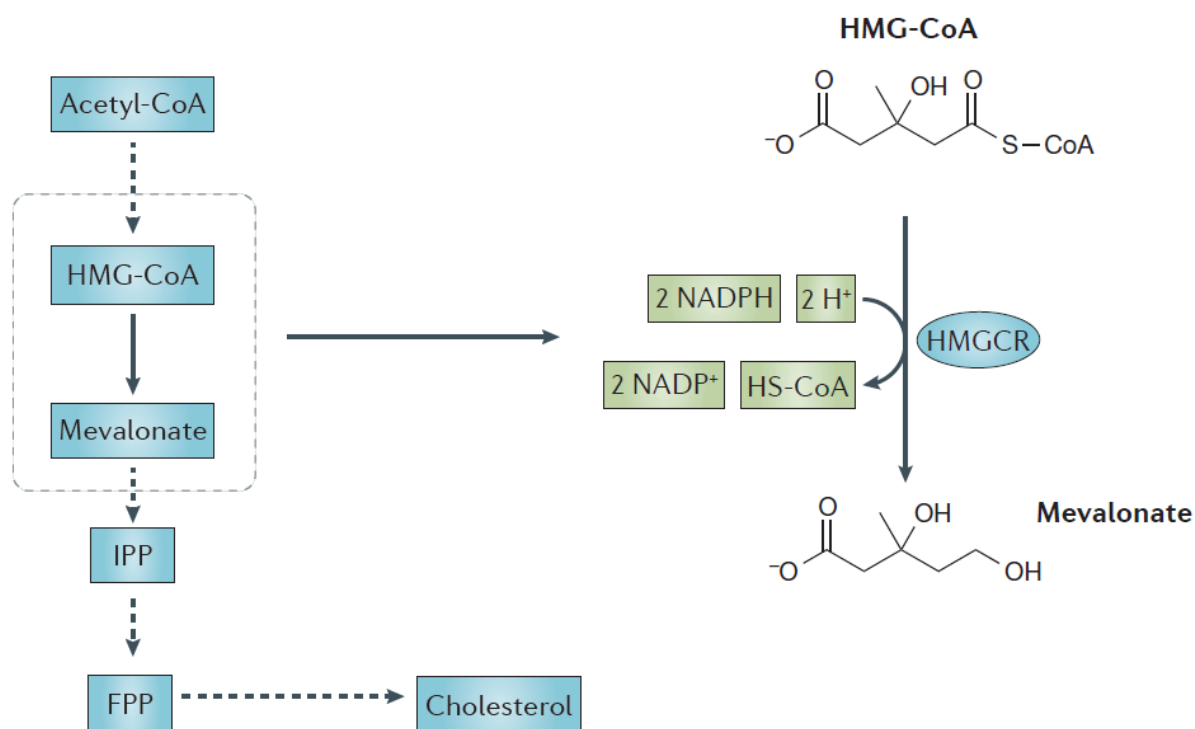


Figura 1.4 - Via do mevalonato (esquerda) e reação catalisada pela HMGCR. Adaptado de ³⁸.

O óleo de sementes de *N. sativa* para além de utilizado na medicina tradicional para reduzir os níveis de colesterol, tem vindo a ser estudado e demonstrou ter atividade inibitória da HMGCR. Num estudo em ratos, depois de 30 dias a administrar uma suspensão aterogénica, os ratos aos quais foi administrado um extrato de óleo, apresentavam uma atividade reduzida de HMGCR. Para além disso, os ratos aos quais apenas foi administrada a suspensão aterogénica, apresentaram um aumento de peso em relação ao controlo e aos tratados com óleo. Este aumento de peso deve-se ao depósito lipídico no corpo, que foi também evitado nos ratos que foram tratados com o extrato do óleo.²⁴

Neste estudo foi relatada a diminuição tanto do colesterol nas lipoproteínas de alta densidade (HDL-C) como do colesterol nas lipoproteínas de baixa densidade (LDL-C), estes parâmetros correspondem à quantidade de colesterol transportada em lipoproteínas de alta e baixa densidade, respetivamente. O LDL-C é conhecido como o “colesterol mau”, uma vez que o seu nível elevado é uma das maiores causas para a doença arterial coronária. O HDL-C é conhecido como o “colesterol bom” sendo que é uma lipoproteína chave para a remoção de lípidos.²⁴

Existem ainda estudos que revelam que existe uma diminuição apenas de LDL-C e que os níveis de HDL-C não apresentam diferenças significativas em comparação com o controlo, em ratos com a administração de óleo.^{39,40}

As estatinas são uma classe de fármacos disponíveis no mercado para baixar o colesterol, têm como alvo e inibem a HMGCR, tendo como objetivo principal a prevenção de doenças cardiovasculares associadas à hipercolesterolemia e aterosclerose. No entanto, as estatinas apresentam potenciais efeitos secundários como mialgias, miosite e ainda das complicações mais bem reconhecida e mais temida, a rabdomiólise. Esta última pode ainda causar danos nos rins.⁴¹ Como tal, novas alternativas são necessárias no controlo da hipercolesterolemia. A utilização de um produto natural, como o óleo de *Nigella sativa*, que demonstrou esta capacidade inibitória, parece uma possível alternativa.

1.3.3.3 Inibição da atividade da acetilcolinesterase (AChE)

Atualmente a doença de Alzheimer (AD) afeta mais de 20 milhões de pessoas mundialmente e este número vai aumentar, no futuro, com o aumento da população idosa. A prevalência tem um grande aumento com a idade, desde os 10% aos 65 anos, chegando quase aos 50% em pessoas com 85 anos.⁴² A AD é a forma mais comum de demência caracterizada por uma perda da memória e outras funções cognitivas. A AD é uma doença neurodegenerativa progressiva que é caracterizada pelas disfunções do sistema colinérgico e depósito de proteínas β -amiloides. Visto que o sistema colinérgico está fortemente associado à regulação dos processos de aprendizagem e memória, o controlo deste tem sido o objetivo principal no design de fármacos contra a AD.

A AChE é uma enzima que, juntamente com os recetores de acetilcolina (ACh), faz parte do sistema colinérgico, funciona no sistema nervoso periférico e central. A função biológica da AChE é hidrolisar o neurotransmissor ACh, para terminar a neurotransmissão na fenda sináptica. A ACh é libertada do nervo pré sináptico onde se difunde através da fenda sináptica e se liga ao recetor de ACh. O sinal é assim propagado para a célula pós sináptica, e a AChE vai hidrolisar a ACh para que a neurotransmissão termine. A colina resultante da hidrólise da ACh volta depois para a célula pré sináptica para a formação de nova ACh. O esquema deste mecanismo é apresentado na **Figura 1.5**.⁴²⁻⁴⁴ A inibição controlada da AChE aumenta a transmissão colinérgica, uma vez que impede que a AChE hidrolise a ACh, o que tem sido uma estratégia utilizada contra a AD.⁴²⁻⁴⁴

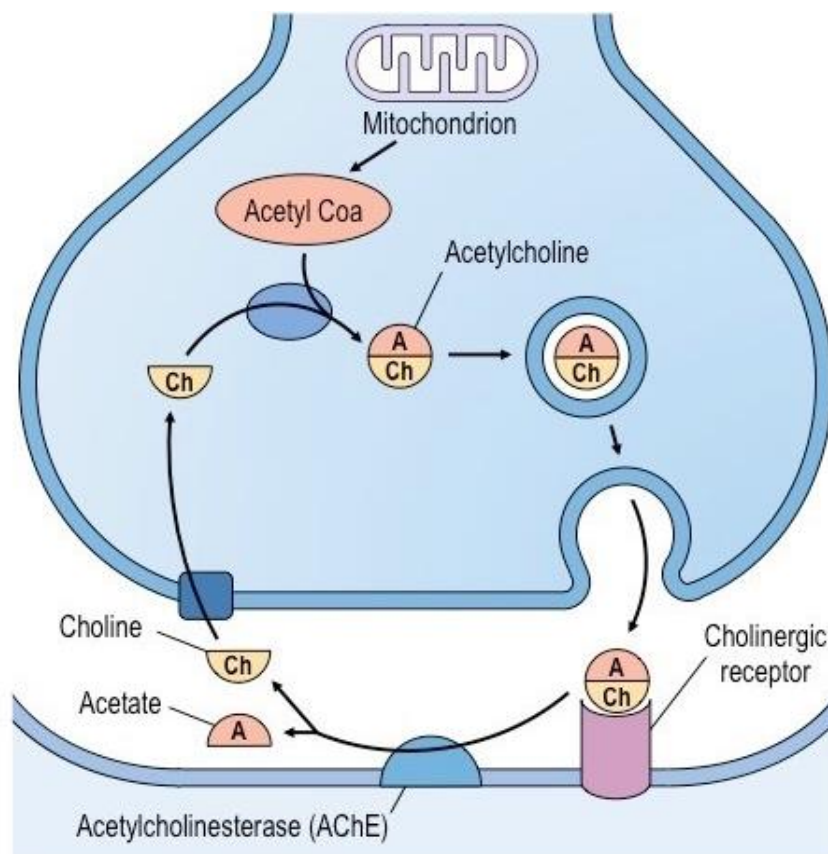


Figura 1.5 - Esquema da fenda sináptica com o ciclo da ACh. Adaptado de ⁴⁵.

Foi demonstrado em estudos anteriores que a administração de óleo de *Nigella sativa* pode melhorar a memória de animais, bem como diminuir a atividade da AChE. Foi também reportado que a administração de cápsulas de *N. sativa* (500 mg), duas vezes ao dia, durante nove semanas, teve um efeito positivo na memória de voluntários idosos.²⁵

Noutro estudo, em ratos, foi administrada escopolamina, este fármaco fez aumentar a atividade da AChE significativamente em relação ao controlo, no entanto, em ratos aos quais foram também administrados um extrato de sementes de *N. sativa* os níveis de atividade da AChE apresentavam-se diminuídos, tendo esta diminuição sido mais acentuada com o aumento da dosagem de extrato de sementes. Neste estudo, o stresse oxidativo no cérebro dos ratos apresentou-se também reduzido quando em contacto com o extrato de sementes.⁴⁶

A AD é considerada uma doença multifatorial, têm sido estabelecidas relações entre os problemas de memória e o stresse oxidativo no cérebro, referindo que danos induzidos pelo stresse oxidativo poderão ter um papel na iniciação e no progresso da doença.⁴⁶

O donepezil é o fármaco mais utilizado para o tratamento da doença de Alzheimer em mais de 50 países, sendo um inibidor da AChE e tem efeito positivo na cognição, comportamento e atividades do dia a dia em casos moderados e severos da doença, no entanto, entre 10% a 70% dos pacientes, apresentam efeitos secundários, dependendo da severidade. Este composto tem muitos efeitos secundários, sendo os mais comuns a agitação dos doentes, disfunção cardiovascular e alteração no metabolismo lipídico, havendo ainda efeitos como dores, enxaqueca, fadiga, entre outras.⁴⁷

Posto isto, a utilização de um produto natural com atividade inibidora da AChE, que facilmente se incorpora na dieta, como o óleo de *N. sativa*, poderá ser uma alternativa ou ajudar no tratamento, bem como melhorar o estilo de vida do paciente, facilitando o tratamento, uma vez que a sua administração pode ser feita através da alimentação. Além disso, visto que o óleo de *N. sativa* tem propriedades antioxidantes, pode ajudar a combater os problemas de memória e a AD com a inibição da AChE e com

a redução do stresse oxidativo.²⁵ Apesar de melhorar a memória, atenção e cognição e poder ser considerada um possível suplemento alimentar de prevenção da AD para os idosos, serão necessários mais estudos a longo prazo para verificar se a *Nigella sativa* é efetivamente apropriada para o tratamento desta doença.⁴⁸

1.3.3.4 Atividade anticancerígena

O cancro é uma das maiores ameaças de hoje em dia, sendo que é a segunda maior causa de morte mundialmente. Em 2012 registaram-se aproximadamente 14 milhões de novos casos e foi responsável por 8,8 milhões de mortes em 2015, o que globalmente corresponde a cerca de uma em cada seis mortes ser devida ao cancro. Cerca de 70 % destas mortes ocorreram em países de baixo e médio rendimento, isto deve-se ao facto de nesses países haver uma maior inacessibilidade a diagnósticos e tratamento. Para além do impacto na saúde mundial, existe também um grande impacto económico, que tem vindo a aumentar. Em 2010 o custo foi estimado em cerca de 1,16 biliões de dólares americanos (USD).⁴⁹

A formação do cancro envolve alterações fisiológicas que provêm de mutações genéticas, permitindo à célula passar por diferentes mecanismos de defesa. Algumas das características fisiológicas que fazem com que a célula consiga proliferar sem controlo são:

- Autonomia relativamente a sinais de crescimento;
- Insensibilidade a sinais antiproliferativos;
- Capacidade de evitar a apoptose;
- Potencial de replicação ilimitado;
- Controlo da angiogénese.

Estas capacidades permitem ultrapassar barreiras de regulação das células para que haja a formação de um cancro, começando por produzir os próprios sinais de crescimento. Numa célula normal, é necessária a presença de sinais de crescimento, que são transmitidos para o seu interior através de recetores transmembranares. Esta dependência implica que as células apenas proliferam quando na presença dos sinais, ao contrário das células tumorais, que estão em constante proliferação, o que indica que muitos dos sinais de crescimento são produzidos pela própria célula. Num tecido saudável, existem vários sinais antiproliferativos para que haja equilíbrio na proliferação celular, no entanto, para o caso das células cancerígenas, há uma resistência a estes sinais. Assim, estas conseguem estar em constante divisão/mitose. A habilidade de expansão da população de células cancerígenas não depende apenas da capacidade de proliferação, mas também da possibilidade de evitar a apoptose. Com estas três capacidades adquiridas (autonomia nos sinais de crescimento, insensibilidade a sinais antiproliferativos e resistência à apoptose) uma célula poderá estar potencialmente em constante proliferação, capacidade de mitose ilimitada, e formar uma grande população de células cancerígenas, constituindo tumores macroscópicos. Por fim, neste ponto, é possível que se forme um aglomerado de células cancerígenas, no entanto, para que estas recebam o oxigénio e nutrientes necessários ao seu funcionamento, estas células têm que estar perto de um vaso sanguíneo, daí ser preciso um controlo da angiogénese para que, à medida que a massa tumoral cresce, haja a formação de vasos sanguíneos, necessários para a garantir que os níveis de oxigénio e de nutrientes se mantêm adequado ao funcionamento das células tumorais.^{50,51}

O óleo de *N. sativa* é reconhecido como um agente com potencial anticancerígeno há milhares de anos pelos povos árabes e chineses, apesar de ser um tratamento da medicina tradicional. Mais recentemente,

nas últimas três décadas, têm sido realizados estudos para verificar o potencial anticancerígeno do óleo das sementes de *N. sativa*.

Em vários estudos este potencial farmacológico tem sido comprovado e pensa dever-se a compostos que estão associados à atividade anticancerígena, como a timoquinona e o timol, entre outros.^{10,52-55}

Alguns estudos apresentam atividade do óleo contra a linha celular MCF-7, correspondente ao cancro da mama. Foram utilizados tanto extratos aquosos como alcoólicos de *Nigella sativa*, em ambos os casos foi verificada atividade anticancerígena.^{56,57}

Foi também estudada a eficácia do óleo *in vivo* em ratos com carcinoma mamário induzido. Neste estudo, num dos grupos foi administrado óleo depois de induzido o cancro e noutro, o óleo foi administrado dias antes da indução. Os resultados mostraram que a frequência de cancros baixou quando o óleo foi administrado como tratamento, no entanto, os carcinomas estavam ausentes no grupo que esteve em contacto com o óleo tempo antes da indução do cancro.⁵³ Isto mostrou que o óleo pode ser mais eficaz quando tomado de forma preventiva.

Um estudo em ratos mostrou que a administração de extrato de *Nigella sativa* reduziu a incidência de tumor em ratos tratados com o agente carcinogénico, metilcolantreno. O grupo ao qual foi administrado o extrato teve uma incidência de 33%, comparando com o controlo, que teve uma incidência de 100%.⁵⁸

O óleo de *Nigella sativa* está associado a atividades anticancerígenas contra o cancro da mama, da pele, hepático, do pulmão, entre outros.²³ Sendo o cancro da mama o cancro mais frequente nas mulheres e o melanoma maligno da pele um cancro agressivo com alta mortalidade e que apresenta baixa resposta aos tratamentos atuais podendo progredir rapidamente^{59,60}, foi analisada a toxicidade do óleo de *N. sativa* contra as linhas celulares de adenocarcinoma mamário MCF-7 e do melanoma maligno da pele A375.

Não foram encontrados, no entanto, estudos contra a linha celular do melanoma maligno da pele A375, ainda assim, sabe-se que existem óleos essenciais eficazes na inibição do crescimento desta linha celular.⁶¹ Visto que os óleos essenciais contêm, muitas vezes, compostos iguais e sabendo que o óleo de *N. sativa* é eficaz contra o cancro de pele, é possível que tenha atividade inibitória para esta linha celular, sendo que esta vai ser testada pela primeira vez neste trabalho.

Tendo em conta que a atividade anticancerígena pode dever-se a diferentes mecanismos, inibição da proliferação celular, atividade antioxidante e indução de apoptose nas células cancerígenas,^{10,52-55} neste trabalho vários estudos vão ser desenvolvidos de modo a perceber a atuação do óleo. Sabe-se que os tratamentos quimioterapêuticos induzem alterações no proteoma dos doentes. Foi verificada em pacientes com osteossarcoma antes e depois do tratamento quimioterapêutico uma alteração muito significativa na expressão de proteínas, como a proteína C-reativa, que tem um papel na inflamação de tecidos, a molécula-1 de adesão vascular, que tem um papel na adesão celular, e a gelsolina, que tem um papel na apoptose.⁶² No entanto, não foram realizados até ao momento quaisquer tipos de estudo em relação às alterações do proteoma celular ou mesmo da estrutura de proteínas que poderá ser induzido pelo óleo de *Nigella sativa*. Como tal, vai ser estudado o perfil proteico da linha celular A375 acima descrita, bem como a estrutura de duas proteínas modelo quando em contacto com o óleo.⁶³

2 Objetivos

Com o trabalho realizado anteriormente pelo grupo, pensa-se que existe capacidade anticancerígena nos compostos voláteis do óleo de *Nigella sativa*. Como tal, o objetivo principal do trabalho foi analisar tanto as capacidades anticancerígenas como outras atividades biológicas frequentemente associadas a este óleo, e, após remover os voláteis do óleo, comparar as atividades com as do óleo com os compostos voláteis. Assim, para cada estudo vão existir dois grupos de amostras, o do óleo com voláteis, que corresponde ao óleo completo de sementes de *Nigella sativa*, e do óleo sem voláteis, que corresponde ao óleo ao qual foi removido os compostos mais voláteis.

Posto isto, os objetivos do trabalho são os seguintes:

- Remover os compostos mais voláteis da matriz do óleo;
- Identificar tanto os compostos removidos, como os que se mantêm no óleo;
- Estudar ambos os óleos (com e sem voláteis) as diferentes atividades biológicas:
 - Atividades antioxidantes;
 - Inibições enzimáticas;
 - Citotoxicidade contra linhas celulares cancerígenas;
- Analisar perfil proteico de células em contacto com o óleo;
- Verificar a capacidade do óleo de provocar alterações estruturais a proteínas modelo.

Com estes objetivos, será possível verificar se existe alguma diferença entre os dois tipos de óleo (com e sem voláteis) tanto a nível de composição química como a nível de atividade biológica, quer seja na perda de atividade, ou melhoramento da mesma.

Na bibliografia, para além de não existirem estudos acerca de óleo de sementes de *Nigella sativa* ao qual lhe foram retirados os compostos mais voláteis, a maior parte dos trabalhos feitos são realizados utilizando extratos em solventes orgânicos. Neste trabalho, todos os ensaios vão ser feitos com o óleo para que se tenha uma ideia mais aproximada das atividades reais do óleo de sementes de *Nigella sativa*. Foram ainda realizados os primeiros estudos do potencial do óleo sobre o proteoma das células do melanoma maligno da pele e que se revelaram importantes para justificar as atividades encontradas.

3 Procedimento Experimental

3.1 Materiais

3.1.1 Óleo

Todo o óleo de sementes de *Nigella sativa* foi amavelmente cedido pelo Professor Parvez Haris da De Montfort University, em Leicester. O óleo foi sempre mantido a 4 °C e tanto no armazenamento como durante os ensaios, quando possível, protegido da luz.

3.1.2 Linhas celulares

As linhas celulares utilizadas foram MCF-7 (ATCC® HTB-22™) e A375 (ATCC® CRL-1619™), que correspondem a células de adenocarcinoma mamário e do melanoma de pele maligno humano, respetivamente.

3.2 Métodos

3.2.1 Determinação da densidade do óleo

Começou-se a caracterização do óleo pelo estudo da densidade. Visto que a densidade do óleo de *Nigella sativa* varia com a temperatura, começou-se por determinar a densidade do óleo à temperatura ambiente, para poder apresentar todas as concentrações de óleo em massa/volume (m/v). Este estudo foi realizado pesando o óleo a vários volumes, começando em 1 mL e com pesagens sucessivas até 5 mL com um passo de 1 mL, os resultados são apresentados na **Tabela 3.1**.

Tabela 3.1 - Pesagem do óleo para a determinação da densidade

Volume (mL)	Massa (g)	Diferença
0	0	0,9620
1	0,9620	0,8969
2	1,8589	0,9066
3	2,7655	0,9145
4	3,6800	0,9536
5	4,6336	

Com estas pesagens, fez-se a média da diferença entre medições e obteve-se uma densidade de $0,9267 \pm 0,0292$ g/mL. Este resultado obtido é idêntico ao apresentado na literatura, que é 0,93 g/mL a 50 °C, aumentando para 0,98 g/mL a temperaturas maiores que 60 °C.⁶⁴

Visto que as medições foram feitas à temperatura ambiente e que o óleo aumenta de densidade com o aumento da temperatura, faz sentido que o resultado obtido seja ligeiramente mais baixo que o apresentado no estudo referenciado.⁶⁴

3.2.2 Preparação das amostras de óleo sem voláteis

Sendo que o óleo das sementes de *Nigella sativa* contém uma grande quantidade de compostos voláteis que têm atividades biológicas, foi decidido realizar estudos em óleo com voláteis (óleo com todos os compostos na sua matriz) e óleo sem voláteis (óleo ao qual lhe foram apenas retirados os compostos mais voláteis e não a sua totalidade). Para se retirarem os compostos mais voláteis, colocaram-se cerca de 15 mL de óleo numa placa de *Petri*, para que tenha uma maior área de superfície em contacto com o ar, e deixou-se num estufa a 60 °C durante 72 horas.

3.2.3 Análise de cromatografia gasosa e identificação de compostos

A cromatografia gasosa foi feita num equipamento Thermo Scientific® Trace GC Ultra com uma coluna capilar Agilent® J&W DB-5ms, um espectrómetro de massa Thermo Scientific® ITQ 900 e o *software* utilizado foi o Xcalibur®.

Foram utilizados dois métodos de recolha/injeção, injeção *split* e SPME (do inglês *Solid-phase microextraction*). Para a injeção *split*, a amostra injetada foi óleo diluído em diclorometano (1:10), o gradiente de temperatura começou a 50 °C, mantendo-se estável durante 2 minutos, seguindo-se de uma subida de temperatura de 3 °C/min até chegar aos 240 °C. O *inlet* estava a 300 °C tendo sido utilizado um *split* de 10 e fluxo de He de 1 mL/min. Para SPME, as amostras tiveram um tempo de incubação de 10 minutos, a 60 °C, a fibra (carboxeno/polidimetilsiloxano) esteve a extrair durante 30 minutos e a desadsorver durante 3 minutos a 280 °C. Para a corrida cromatográfica, o gradiente de temperatura começou nos 50 °C mantendo-se estável durante 2 minutos, subindo depois a 5,8 °C/min até chegar aos 250 °C onde se manteve durante 5 minutos.

Para as identificações, recorreu-se às seguintes bases de dados: WILEY6 (Wiley®), mainlib (NIST®) e replib (NIST®).

3.2.4 Quantificação de fenóis totais

A quantificação de fenóis foi feita através do método de Oktay *et al.* (2007) com algumas adaptações.⁶⁵ O método utiliza o reagente de Folin-Ciocalteu para a detecção de fenóis, isto é conseguido através dos átomos do molibdénio presentes no reagente, que vão ser reduzidos por eletrões provenientes de compostos fenólicos, entre outros. O meio alcalino potencia a reação em questão e a redução do molibdénio forma um complexo azul que permite a sua quantificação espectrofotometricamente a 760 nm.

A mistura reacional preparada consistia em 850 µL de uma solução de Na₂CO₃ 2% (m/v), 100 µL de reagente de Folin-Ciocalteu, 40 µL de água e, por fim, 10 µL de óleo. Após a preparação da mistura, esta manteve-se em agitação num agitador orbital à temperatura ambiente durante 3 horas. No fim do tempo estipulado, a mistura foi centrifugada a cerca de 9300 g durante 3 minutos. Finalmente, a absorvância foi medida a 760 nm num equipamento M350 Double Beam UV-Vis Spectrophotometer. O padrão utilizado para esta reação é o ácido gálico, com o qual se traçou uma curva de calibração de absorvância vs concentração. A equação obtida foi:

$$A = 0,0961c + 0,0261$$

Eq. 3.1

Onde A corresponde à absorvância e c corresponde à concentração de fenóis em mg de equivalentes de ácido gálico por mg de óleo (mg GAE/mg óleo). Os ensaios foram realizados em triplicado.

3.2.5 Atividade antioxidante

Para a determinação da atividade antioxidante, foi adaptado o método do DPPH[•] de Tepe *et al.* (2005).⁶⁶ Neste método, a amostra a ser estudada é misturada numa solução contendo o radical DPPH[•]. Quando na presença de uma espécie antioxidante, o radical vai ser reduzido, alterando a sua cor do roxo (cor normal, que absorve a 517 nm) para o amarelo, ou seja, quanto maior a capacidade antioxidante do composto em estudo, menor a absorvância a 517 nm. O esquema da reação pode ser observado na **Figura 3.1**.

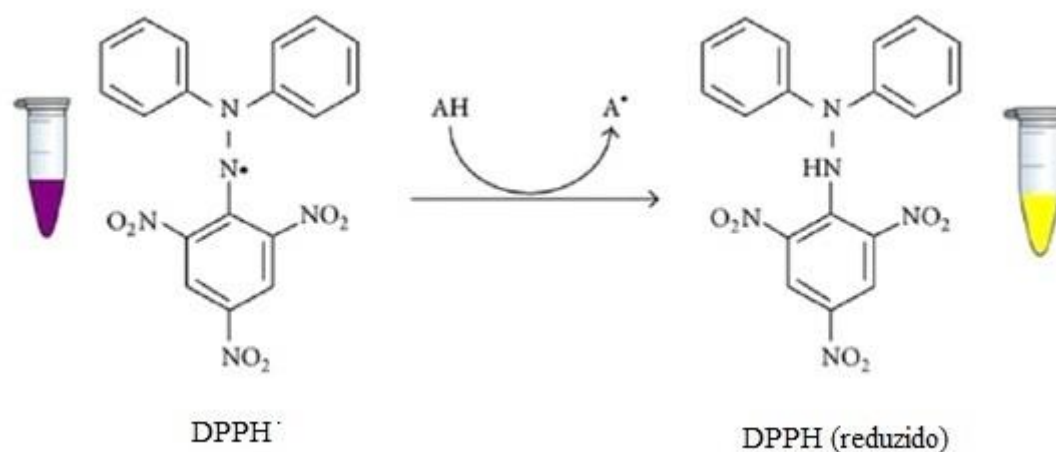


Figura 3.1 - Reação de redução que ocorre no método colorimétrico do DPPH, o radical DPPH[•] é reduzido na presença de um agente antioxidante AH.⁶⁷

Nos ensaios realizados, foi usado 1 mL de uma solução de DPPH[•] a 0,002 % (m/v) em DMSO. A esta adicionou-se 10 µL de óleo em diferentes concentrações (entre 0,93 e 9,27 µg/mL). Para o controle foi adicionada água em vez do óleo. Cada solução foi incubada durante 30 minutos à temperatura ambiente, sendo depois medida para cada, a respetiva absorvância a um comprimento de 517 nm. Cada ensaio foi realizado em triplicado e a atividade antioxidante foi calculada através da seguinte equação:

$$AA (\%) = \frac{A_{DPPH} - A_{\text{óleo}}}{A_{DPPH}} \times 100$$

Eq. 3.2

Onde AA (%) é a atividade antioxidante expressa em percentagem, o A_{óleo} é a absorvância medida para as amostras de óleo e o A_{DPPH} a absorvância do controlo. O EC₅₀ foi calculado correspondendo à concentração de óleo necessária para extinguir 50% dos radicais DPPH[•].

3.2.6 Inibição da peroxidação lipídica

A inibição da peroxidação lipídica foi determinada utilizando o teste dos TBARS (do inglês *thiobarbituric acid reactive substances*). Este método mede a quantidade de MDA (malondialdeído) que se forma como resultado da oxidação dos lípidos presentes numa amostra de salmão, provocada por uma solução de H_2O_2 .⁶⁸ O MDA formado vai depois reagir com o TBA (do inglês *thiobarbituric acid*) para formar um pigmento cor-de-rosa (que absorve a 535 nm), ou seja, quanto maior for a peroxidação lipídica na amostra de salmão, maior será a absorvância a 535 nm.

O esquema de reação pode ser observado na **Figura 3.2**.

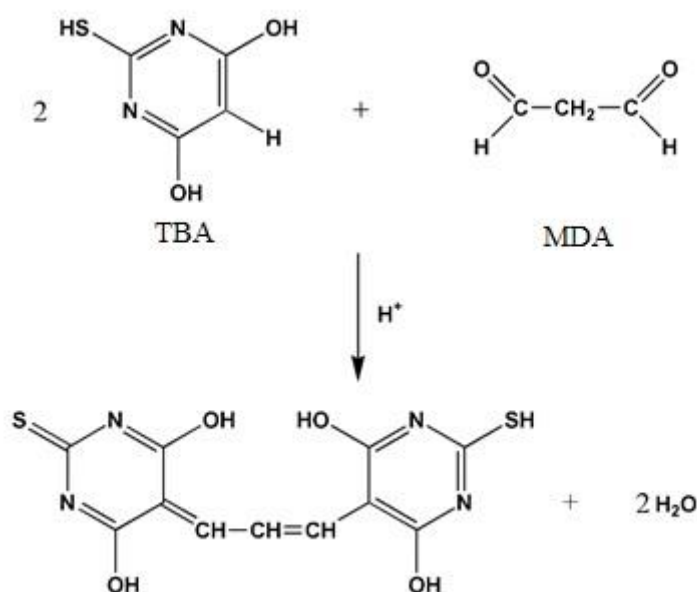


Figura 3.2 - Reação que ocorre no método do TBARS.⁶⁸

O estudo da inibição da peroxidação lipídica pelo óleo foi feito na presença de diferentes concentrações de óleo, de modo a avaliar se este seria capaz de impedir a formação do pigmento rosa, ou seja, quanto maior for a inibição da peroxidação pelo óleo, menos cor terá a mistura reacional referida. Para este ensaio, homogeneizou-se 1 g de salmão em 9 mL de PBS 1x (do inglês *phosphate-buffered saline*), a este foi adicionado 1 mL de óleo a diferentes concentrações (entre 7,13 e 71,29 $\mu\text{g/mL}$), 1 mL de FeSO_4 (15 mM) e 2 mL de H_2O_2 (1 mM). Esta mistura foi incubada durante 1 hora a 37 °C num banho de água. Foi depois retirada uma alíquota de 0,5 mL, sendo a esta adicionado 0,25 mL de TBA (1% m/v) e 0,25 mL de TCA (do inglês “trichloroacetic acid”) (2,8 % m/v), seguindo-se uma incubação de 10 minutos em água a 100 °C. Depois deste tempo, as amostras foram a um banho de gelo durante 5 minutos. Finalmente, foram adicionados 2 mL de butanol, e esperou-se a formação de duas fases. A fase superior foi então retirada e medida a sua absorvância a 535 nm. Para este estudo, são feitos dois controlos, um de 100% de oxidação e um de 0% de oxidação. No controlo de 100%, em vez da adição de 1 mL de óleo, foi adicionado 1 mL de PBS 1x. No controlo de 0% de oxidação, ao salmão homogeneizado em PBS 1x, foram apenas adicionados 4 mL de PBS 1x. Todos os ensaios foram realizados em triplicado e os resultados das medições para o controlo de 0% de oxidação foram subtraídos a todos os outros valores. A inibição da peroxidação lipídica foi calculada segundo a seguinte equação:

$$IPL (\%) = \frac{A_{100\%} - A_{\text{óleo}}}{A_{100\%}} \times 100$$

Eq. 3.3

Onde IPL (%) é a inibição da peroxidação lipídica expressa em percentagem, o $A_{\text{óleo}}$ é a absorvância medida para os testes com as diferentes concentrações de óleo e o $A_{100\%}$ é o controlo com 100% de oxidação. O IC_{50} corresponde à concentração necessária para inibir 50% da peroxidação lipídica.

3.2.7 Inibição da atividade da HMGCR

Para a determinação da atividade da enzima HMGCR, foi utilizado um *kit* da Sigma-Aldrich®. No *kit* utilizado para este estudo, é quantificada a quantidade de NADPH ao longo do tempo, espectrofotometricamente, que vai diminuindo à medida que é consumido pela enzima para formação de mevalonato a partir do substrato, HMG-CoA. A reação que ocorre está esquematizada na **Figura 3.3**.



Figura 3.3 - Reação que ocorre no *kit* de determinação da atividade da HMGCR.

As amostras foram todas feitas seguindo as concentrações estabelecidas pelo *kit*. Para a amostra controlo, que corresponde a 100% de atividade enzimática, juntaram-se 457,5 µL de solução tampão, 10 µL de NADPH, 30 µL de substrato HMG-CoA e finalmente 2,5 µL da enzima HMGCR. Para as amostras de óleo, foram variadas as concentrações de óleo (entre 0,93 e 9,27 µg/mL para o óleo com voláteis e entre 1,85 e 18,53 µg/mL para o óleo sem voláteis), substituindo por parte do volume de tampão, para um volume total de 500 µL. Depois de adicionada a enzima, para iniciar a reação houve o cuidado de rapidamente agitar e retirar a primeira amostra (T0). A atividade enzimática foi quantificada por quantificação da diminuição do NADPH na mistura reacional ao longo do tempo em tomas aos tempos 0, 1, 2 e 4 minutos (T0, T1, T2, T4, respetivamente). A cada tempo foram retirados 90 µL, que foram colocados em 90 µL de metanol, para parar a reação e o NADPH quantificado.

Para fazer a quantificação do NADPH, foi utilizado o método descrito por Mozzicafreddo *et al.* (2010), com o equipamento, HPLC VWR – Hitachi LaChrom Elite®, com uma coluna LiChroCART® 250-4 LiChrospher® 100 RP-18 (5 µm) da Merck. As condições da corrida cromatográfica utilizada para a determinação da quantidade do NADPH estão na **Tabela 3.2**, onde a solução A é metanol e a B é uma solução de KH_2PO_4 100 mM, a absorvância foi registada a 340 nm.

Tabela 3.2 - Condições da corrida cromatográfica do ensaio de atividade da HMGCR.

Tempo (minutos)	% A	% B	Fluxo (mL/min)
0	5	95	0,8
15	30	70	
20	80	20	
23	80	20	
27	5	95	
30	5	95	

Aos cromatogramas obtidos, foi calculada a área do pico correspondente ao NADPH, ao longo do tempo. Fazendo uma regressão linear dos valores calculados, o declive da reta obtida corresponde à atividade da enzima.

Para o cálculo da inibição da HMGCR, foi utilizada a seguinte equação:

$$I (\%) = 100 - \left(\frac{A_{\text{óleo}}}{A_{\text{controle}}} \times 100 \right)$$

Eq. 3.4

Sendo que $I (\%)$ é a inibição da atividade da HMGCR expressa em percentagem, o $A_{\text{óleo}}$ é a atividade da enzima na presença do óleo e o A_{controle} a atividade da enzima na ausência de inibidor. O IC_{50} foi calculado e corresponde à concentração de óleo necessária para inibir 50% da atividade da HMGCR.

3.2.8 Inibição da atividade da AChE

Para quantificar a atividade enzimática da AChE, foi realizada uma cinética enzimática, onde a enzima degrada o iodeto de acetiltiocolina (AChI) em acetato e tiocolina, a última reage com DTNB (ácido 5,5-ditio-bis-(2-nitrobenzoico)) que forma o anião 2-nitro-5-tiobenzoato que tem uma cor amarela (que absorve a 405 nm).⁶⁹ A reação está ilustrada na **Figura 3.4**.

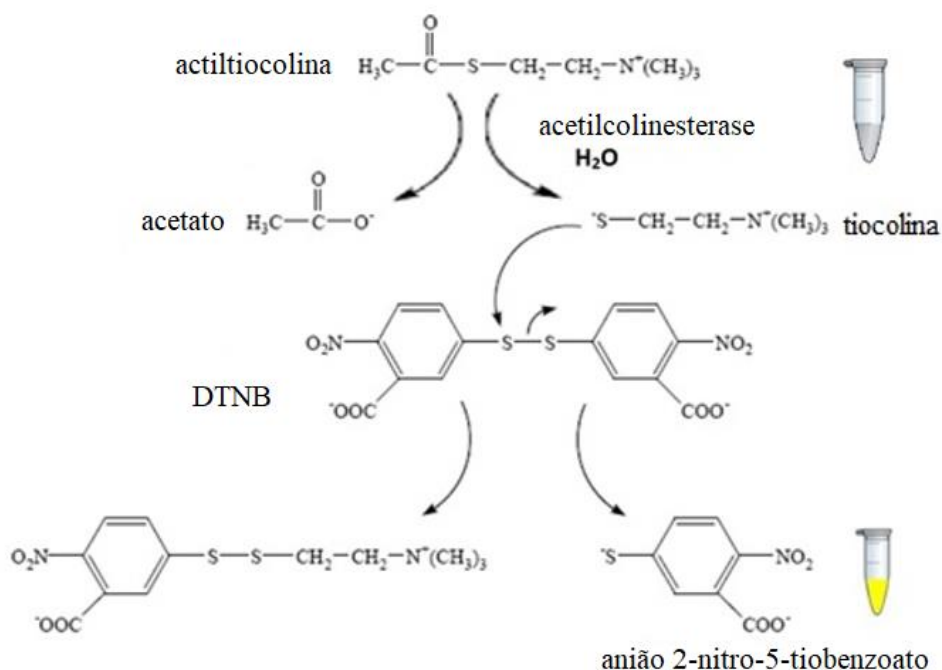


Figura 3.4 - Reação que ocorre na quantificação da atividade da AChE.⁶⁷

A quantificação da atividade da AChE na presença do óleo foi feita utilizando 415 μL de tampão TRIS (50 mM a pH 8), 10 μL de óleo a várias concentrações (diluído numa solução de MeOH e 4% de DMSO) e 25 μL de AChE (5 U/mL). Estas soluções foram incubadas à temperatura ambiente durante 15 minutos. Depois disso foram adicionados para iniciar a reação 75 μL de AChI (0,33 mg/mL) e 475 μL de DTNB (1,2 mg/mL). A variação de absorvância ao longo do tempo foi registada a 405 nm durante 4 minutos e determinada a atividade da enzima na presença do óleo $A_{\text{óleo}}$. Cada ensaio foi realizado em triplicado e foi feito um controlo na ausência de óleo para determinar a atividade da enzima sem inibidor em solução A_{controle} . A percentagem de inibição da atividade enzimática na presença de diferentes concentrações de óleo foi calculada usando a equação seguinte:

$$I (\%) = 100 - \left(\frac{A_{\text{óleo}}}{A_{\text{controlo}}} \times 100 \right)$$

Eq. 3.5

Sendo que I (%) é a inibição da atividade da AChE expressa em percentagem, o $A_{\text{óleo}}$ é a atividade da enzima na presença do óleo e o A_{controlo} a atividade da enzima na ausência de inibidor. O IC_{50} foi calculado e corresponde à concentração de óleo necessária para inibir 50% da atividade da AChE.

3.2.9 Citotoxicidade do óleo para as linhas celulares MCF-7 e A375

3.2.9.1 Crescimento celular

Para realizar os estudos de citotoxicidade do óleo em células do cancro da mama (MCF-7) e do melanoma (A375), houve um período de crescimento no qual as células se multiplicam até uma quantidade desejada. Para estas linhas celulares, utilizou-se meio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino, 100 U/mL de penicilina-estreptomicina e 2 mM de L-glutamina, e foram mantidas numa incubadora a 37 °C e 5% de CO₂. As células foram crescidas em frascos T-25, trocando o meio a cada 48/72 h, e quando atingiram 90% de confluência (aproximadamente), foram tripsinizadas. Neste processo, a tripsina é utilizada para degradar as proteínas que facilitam a aderência das células ao frasco. Primeiro as células foram lavadas com PBS 1x e as células são incubadas com tripsina 1x a 37 °C durante 5 minutos, depois disso as células ficam em suspensão, podendo assim ser contadas utilizando um hemacitómetro. Depois preparou-se uma suspensão celular no mesmo meio de cultura, com a concentração de 50×10^4 cel/mL e cultivadas numa microplaca de 96 poços, onde são adicionados 100 µL da suspensão em cada poço. Por fim, a microplaca foi mantida na incubadora, nas mesmas condições acima descritas durante 48 horas ou até à confluência.

3.2.9.2 Ensaio de viabilidade celular

Este método, utiliza o reagente MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio), que é de cor amarela e é adicionado ao meio celular. Devido à ação do metabolismo celular das células viáveis, o MTT vai sofrer uma redução, formando formazan ((E,Z)-5-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-1,3-difenilformazan)), que forma cristais roxos, insolúveis em água que são dissolvidos em DMSO e cuja absorvância a 595 nm é registada. Quanto maior o numero de células viáveis em cultura, mais roxa fica a solução devido ao facto de ter havido a formação de mais cristais e, portanto, maior a absorvância registada a 595 nm. A redução anteriormente descrita está ilustrada na **Figura 3.5**.⁷⁰

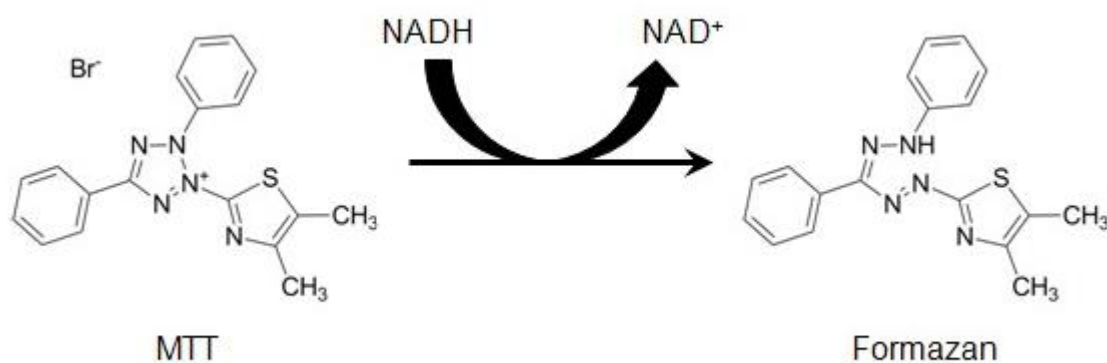


Figura 3.5 - Reação que ocorre no método colorimétrico de viabilidade celular, MTT.⁷⁰

Para este teste, são utilizadas as células crescidas em microplacas de 96 poços preparadas como descrito em “3.2.9.1 Crescimento celular”. Retirou-se o meio de cultura em que as células foram crescidas e é substituído por 100 µL de diferentes concentrações de óleo em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, 100 U/mL de penicilina-estreptomicina e 2 mM de L-glutamina contendo DMSO (1:5). A microplaca foi coberta com parafilme para que os compostos voláteis não interferissem entre poços vizinhos e incubada durante 24 horas a 37 °C e 5% de CO₂.

Foi efetuado um ensaio controlo correspondendo a 100% viabilidade celular em que as células foram incubadas apenas com 100 µL do mesmo meio na ausência de óleo. Depois da incubação, retirou-se o meio de cultura que foi substituído por uma solução de MTT 0,5 mg/mL dissolvido em meio DMEM suplementado com 100 U/mL de penicilina-estreptomicina e 2 mM de L-glutamina e deixado a incubar nas mesmas condições por 2 horas. Este tempo é o necessário para que as células vivas reduzam o MTT através das redutases celulares e formem os cristais de formazan. Para finalizar, retira-se a solução de MTT e são adicionados 100 µL de DMSO aos poços para que os cristais se dissolvam. A microplaca foi incubada durante 1 hora à temperatura ambiente e finalmente a absorvância foi registada ao comprimento de onda de 595 nm e com referência a 630 nm. A morte celular foi calculada utilizando a seguinte equação:

$$MC (\%) = \left(1 - \frac{A_{\text{óleo}}}{A_{\text{controlo}}}\right) \times 100$$

Eq. 3.6

Onde MC (%) é a percentagem de morte celular, $A_{\text{óleo}}$ é a absorvância registada para as células expostas a diferentes concentrações de óleo e A_{controlo} é a absorvância das células controlo com 100% viabilidade celular.

O LC₅₀ foi calculado correspondendo à concentração necessária para matar 50% do número de células.

3.2.10 Estudo de perfil proteico da linha celular A375

3.2.10.1 Preparação celular

Tal como para os estudos de citotoxicidade, foi necessária a preparação das células (A375), como descrito em “3.2.9.1 Crescimento celular”. O método descrito foi utilizado também para a preparação das células para os estudos de perfil proteico, tendo sido feitas algumas adaptações. Devido a ser necessário um número maior de células para este estudo, as células foram crescidas em frascos T-75 e tratadas de maneira idêntica à anteriormente descrita. Quando se obteve a confluência desejada (no mínimo 90%), as células foram tripsinizadas, como descrito anteriormente, e semeados 7,5 mL de uma suspensão célula com a concentração de 50×10^4 cel/ mL em dois frascos T-25 e incubadas nas condições descritas anteriormente durante 48 horas. De seguida, a um dos frascos aplicou-se uma solução de óleo à concentração correspondente ao LC_{50} (1,28 μ g/mL) das células (A375) em meio DMEM suplementado com 100 U/mL de penicilina-estreptomicina e 2 mM de L-glutamina e ao frasco designado por controlo foi colocado meio DMEM suplementado com 100 U/mL de penicilina-estreptomicina e 2 mM de L-glutamina. Os frascos foram incubados durante 24 horas a 37 °C e 5% de CO_2 . Após a incubação o meio foi descartado e as células foram lavadas com água destilada 2 x. As células foram finalmente ressuspensas em água destilada até que todas se soltassem do frasco e recolhidas para serem rebentadas por sonicação, centrifugadas a cerca de 15000 g e o sobrenadante recolhido e guardado a -20 °C para as análises subsequentes. A quantidade de proteína no sobrenadante recolhido foi quantificada pelo método de Bradford.⁷¹

3.2.10.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições nativas (PAGE-nativa)

Primeiro preparou-se o gel num sistema da Bio-Rad “Mini-Protean 3 cell” e foi utilizado um gel de concentração de 4% e um gel de resolução de 7,5% acrilamida-bisacrilamida. A corrida eletroforética foi feita a uma diferença de potencial de 100 V durante aproximadamente 2 horas. O tampão utilizado para a corrida de eletroforese foi o tampão Tris-HCl 0,0025 M contendo 0,192 M de glicina a pH 8,3. Para cada sobrenadante recolhido em 3.2.10.1, foi adicionado o mesmo volume de tampão de aplicação, contendo glicerol 43% (v/v), azul de bromofenol a 0,5% (m/v) numa proporção 1:2 e sobrenadante das células em contacto com o óleo e controlo, de modo a ter 30 μ g de proteína em cada poço. Foi utilizado o marcador de peso molecular NZYTech® Blue Protein Marker. Após a corrida da eletroforese o gel foi corado com uma solução de azul de Coomassie R-250 40%, metanol 50% e ácido acético glacial 10%. Posteriormente os géis foram descorados com uma solução contendo ácido acético glacial 10%, metanol 30% e água destilada 60%.

Para a análise dos géis de eletroforese foi utilizado o *software* ImageJ.

Para calcular o peso molecular, foi traçada uma reta de calibração com marcador eletroforético. Obteve-se a seguinte equação:

$$\log(PM) = -0,1713M \times 2,4993$$

Eq. 3.7

Onde PM corresponde ao peso molecular e M à migração das bandas. Os ensaios foram realizados em duplicado.

3.2.11 Análise de Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de perfil celular foram realizados num aparelho Nicolet® FT-IR spectrometers da Thermo Electron Corporations usando um detetor DTGSTEC, com uma resolução de 4 cm⁻¹ e 200 varrimentos, na gama entre os 400 cm⁻¹ e os 4000 cm⁻¹. Utilizou-se o *software* OMNIC para a aquisição dos espectros. Para cada amostra, foram colocados 10 µL do sobrenadante celular obtido como no ponto 3.2.10.1 numa célula de CaF₂, colocando-se estas sob fluxo de N₂ até evaporar maior parte da água.

Para os espectros da estrutura proteica, foi utilizado um equipamento Bruker® Alpha com um módulo de ATR, com uma resolução de 9 cm⁻¹ e 16 varrimentos, na gama entre os 400 cm⁻¹ e os 4000 cm⁻¹, sendo que foi focada a zona entre os 1400 cm⁻¹ e os 1800 cm⁻¹. Utilizou-se o *software* OPUS para a aquisição dos espectros. Para cada amostra, foram colocados 10 µL da mesma, cobrindo a totalidade do cristal e uma vez que os estudos foram realizados em água, aguardou-se cerca de 15 minutos após colocar a amostra, para deixar que se forme uma camada de proteína com o mínimo de interferência da água.

Para que a visualização dos espectros seja facilitada, todos estes foram normalizados segundo a seguinte equação:

$$P_{Norm} = \frac{P}{(AmI_{Máx} - A_{Min})}$$

Eq. 3.8

Na equação, o P é o valor de absorvância de um ponto antes da normalização, P_{Norm} corresponde à absorvância de um ponto já normalizado, AmI_{Máx} corresponde ao valor máximo da amida I (entre 1600 cm⁻¹ e 1700 cm⁻¹) e por fim A_{Min} corresponde ao mínimo do espectro.

Todos os dados foram tratados através do *software* Microsoft® Excel.

Para estudar se havia alteração estrutural a nível proteico, foram usadas duas proteínas modelo Albumina de Soro Bovino (BSA) e Lisozima (Lys). Para as análises de FTIR foram preparados dois tipos de amostras: amostras em contacto com o óleo e amostras apenas em contacto com os voláteis. Em ambos os grupos de amostras foi utilizado apenas o óleo com voláteis. Para as amostras em contacto com o óleo juntaram-se 100 µL de óleo com voláteis, 100 µL de uma solução de proteína com a concentração de 40 mg/mL no caso da BSA e 27 mg/mL no caso da Lys, ambas em tampão fosfatos 10 mM. Depois de adicionada a solução de proteína, esta foi agitada e de seguida retirada, com o cuidado de tentar retirar apenas a fase aquosa, separando assim a proteína do óleo, identificadas como BSA+OA 0 h e Lys+OA 0 h para a BSA e Lys, respetivamente. Os controlos destas amostras, foram preparados da mesma forma, exceto a presença do óleo, sendo identificados como BSA+A 0 h e Lys+A 0 h para a BSA e Lys, respetivamente. Foi realizada ainda outra medição, preparada de forma idêntica, mas agitada durante 72 horas num agitador orbital, identificadas como BSA+OA 72 h e Lys+OA 72 h para a BSA e Lys, respetivamente sendo os controlos identificados como BSA+A 72 h e Lys+A 72 h. Para as amostras apenas em contacto com os voláteis foi feita uma medição com 24 e 72 horas de exposição, identificadas como BSA+VT 24 h e BSA+VT 72 h nos ensaios de BSA, e Lys+VT 24 h e Lys+VT 72 h nos ensaios de Lys. Para estes casos, numa microplaca de 96 poços, foram colocados 100 µL de proteína com as concentrações acima descritas e adicionados 100 µL de óleo com voláteis em cada um dos poços adjacentes. A microplaca foi depois colocada numa estufa a 37 °C durante as 24 e 72 horas. Uma vez que após as 72 horas a água já tinha evaporado, a proteína foi ressuspensa em 100 µL de água destilada antes de ser analisada. Os controlos destas amostras apenas diferem no facto de não terem óleo na microplaca, sendo estes identificados como BSA+T 24 h e BSA+T 72 h para o caso da BSA, e Lys+T 24 h e Lys+T 72 h no caso da Lys.

4 Resultados e Discussão

De modo a cumprir o objetivo deste trabalho, começou-se por identificar os compostos do óleo com voláteis e verificar os que permanecem no óleo sem voláteis.

4.1 Identificação de compostos por GC-MS

Como descrito em “1.1 Problemática”, os compostos voláteis do óleo pareciam apresentar atividade anticancerígena, como tal, foi realizada a análise dos compostos do óleo com voláteis e do óleo sem voláteis através de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS) e foram identificados os compostos presentes.

Para melhor estudar as diferenças entre os dois tipos de óleo, foram também utilizadas duas técnicas de injeção, injeção *split* e *headspace*, através de SPME. Na injeção *split* é injetado um volume de amostra, onde parte desse volume é descartado e apenas uma pequena porção entra na coluna. A quantidade de amostra descartada é controlada através do *split ratio*, quanto maior este rácio, maior a quantidade que é desprezada. Com a utilização de SPME, a fibra nunca entra em contacto com o óleo, capturando apenas os compostos mais voláteis que se encontram no *headspace*.

4.1.1 Injeção *split*

Através da injeção *split* foi possível identificar os compostos que se encontram na matriz do óleo e não apenas os mais voláteis. O cromatograma obtido do óleo com voláteis é apresentado na **Figura 4.1**.

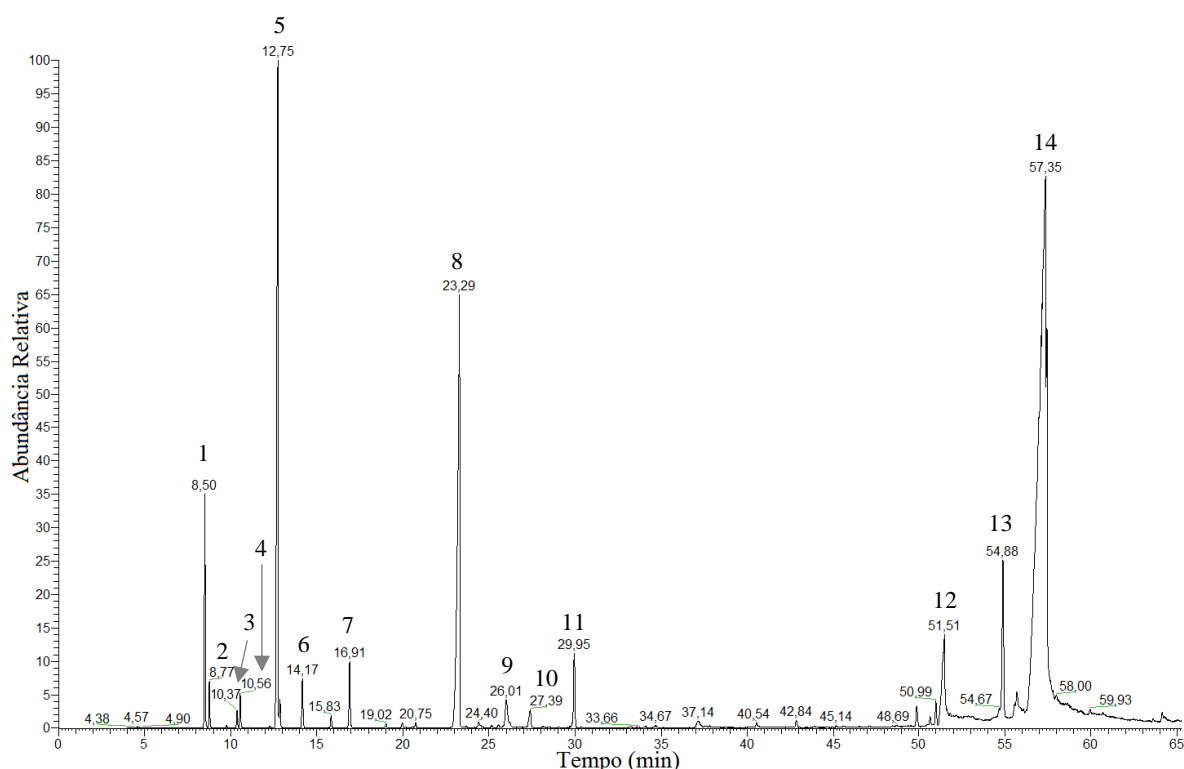


Figura 4.1 - Cromatograma do óleo com voláteis obtido por GC-MS de acordo com a metodologia descrita em 3.2.2 com injeção *split*.

Foi também injetado o óleo sem voláteis e que foi sujeito ao tratamento descrito em 3.2.2 e na **Figura 4.2** encontra-se o cromatograma obtido.

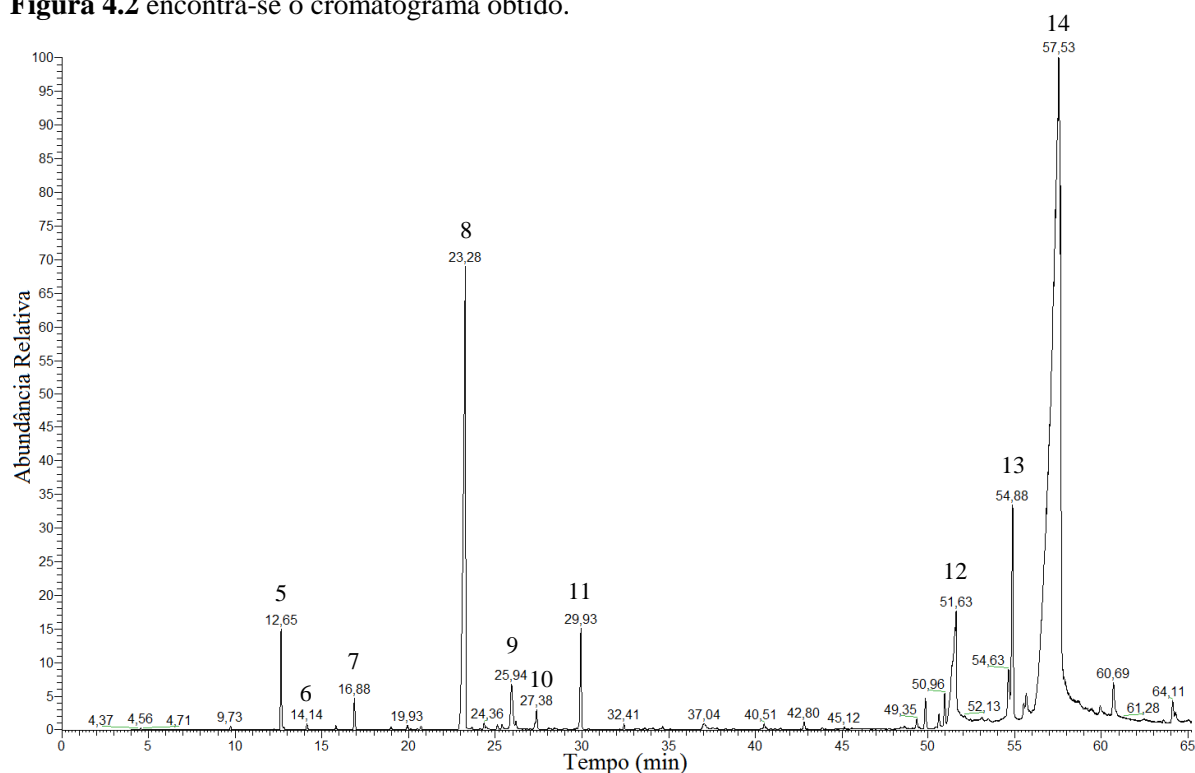


Figura 4.2 - Cromatograma do óleo sem voláteis obtido por GC-MS de acordo com a metodologia descrita em 3.2.2 com injeção *split*.

Os compostos foram identificados através dos espectros de massa aos diferentes tempos de retenção (*tr*) dos picos de maior intensidade (Anexo A), numerados nas figuras anteriores. Na tabela seguinte estão as identificações, bem como a comparação entre os compostos presentes no óleo sem voláteis em relação ao óleo com voláteis.

Tabela 4.1 - Identificações dos picos numerados nos cromatogramas do óleo com e sem voláteis (**Figura 4.1** e **Figura 4.2**, respetivamente) de acordo com os espectros de massa (Anexo A), bem como a comparação entre ambos (n.i. – não identificado).

ID	Óleo com voláteis	Óleo sem voláteis
1	α -tujeno	Não presente
2	α -pineno	Não presente
3	sabineno	Não presente
4	3-careno	Não presente
5	cimeno (orto/para)	Muito diminuído
6	γ -terpineno	Muito diminuído
7	hidrato de trans-sabineno	Diminuído
8	timoquinona	Diminuído
9	timol	Idêntico
10	α -longipineno	Idêntico
11	longifoleno	Idêntico
12	ácido palmítico	Idêntico
13	n.i.	Idêntico
14	etil linoleato e metil linoleato	Idêntico

A coluna utilizada, tendo já algum uso, não tem as mesmas propriedades que tinha, uma vez que as colunas perdem eficiência ao longo do tempo, principalmente por causa da perda de fase estacionária através de degradação química e térmica.⁷² Esta perda de fase estacionária (*bleed*) leva também a um aumento da *baseline*, principalmente a temperaturas mais altas, que é quando este *bleed* é mais intenso.⁷² Isto nota-se a partir de cerca de $t_r = 52$ min (200 °C) na **Figura 4.1** e **Figura 4.2** e nas seguintes **Figura 4.3** e **Figura 4.4** a cerca de $t_r = 28$ min (200 °C), este aumento é mais visível na **Figura 4.4** devido ao facto de não existirem picos muito abundantes que o mascaram. Este ruído dificulta as identificações uma vez que nos espetros de massa, aparecem picos que podem não pertencer ao composto que está a eluir a esse tempo. Devido a isto, não foi possível identificar o pico ID 13. Para além do aumento da *baseline*, a degradação da coluna leva também a uma perda de resolução.⁷² No caso do pico ID 14, nota-se que o pico não está bem resolvido e dependendo da zona do pico na qual se retira o espetro de massa, é possível identificar tanto etil como metil linoleato. Isto indica que possivelmente o óleo contém ambos os compostos, mas não foi possível separá-los devido à semelhança dos mesmos.^{73,74}

Apesar de haver as interferências acima descritas foi possível identificar os compostos correspondentes aos picos mais intensos, e foi possível verificar que todos os compostos presentes na **Tabela 4.1** foram também identificados em trabalhos anteriores.^{4,13,75–79}

No caso do cimeno (ID 5), com os dados obtidos, não é possível garantir se o composto presente é orto ou para, ou ambos, no entanto, o composto *p*-cimeno é o que mais vezes é identificado na literatura para o óleo de sementes de *Nigella sativa*.^{4,75,80–83}

Repara-se pela **Figura 4.1** que os compostos que apresentam maior abundância relativa, no óleo com voláteis são o cimeno (ID 5), o etil/metil linoleato (ID 14) e timoquinona (ID 8), no óleo sem voláteis, na **Figura 4.2**, são o etil/metil linoleato (ID 14), timoquinona (ID 8) e o composto que não foi possível identificar (ID 13) devido aos problemas associados ao desempenho da coluna referidos anteriormente. Da comparação dos cromatogramas resultantes de ambos os óleos, com e sem voláteis (**Figura 4.1** e **Figura 4.2**, respetivamente), é evidente uma grande diminuição no óleo sem voláteis da abundância relativa dos compostos identificados até à timoquinona (ID 8), que sofre uma redução mais baixa. Assim, a comparação entre cromatogramas mostra que a maior parte dos compostos mais voláteis foram retirados no óleo sem voláteis, nomeadamente e de forma mais notória o α -tujeno (ID 1), α -pineno (ID 2), sabineno (ID 3) e 3-careno (ID 4) que foram completamente removidos, quanto ao cimeno (ID 5), e γ -terpineno (ID 6), apesar de não terem sido removidos na totalidade, a sua intensidade foi muito diminuída. No caso do hidrato de trans-sabineno (ID 7), timoquinona (ID 8), verifica-se uma menor diminuição na sua abundância relativa no óleo sem voláteis comparativamente ao óleo com voláteis.

4.1.2 SPME

De modo a avaliar se o tratamento descrito em “3.2.2 Preparação das amostras de óleo sem voláteis” foi eficiente para retirar os compostos mais voláteis do óleo foram ainda analisados os óleos com e sem voláteis através de SPME, este procedimento permite analisar os compostos que estão no *headspace* das amostras, logo, neste caso, os compostos que estão presentes nos vapores libertados pelos óleos com e sem voláteis sobre os quais se coloca a dúvida da sua bioatividade como descrito em “1.1 Problemática”.

Os cromatogramas para os compostos presentes no *headspace* do óleo com e sem voláteis são apresentados na **Figura 4.3** e **Figura 4.4**, respetivamente.

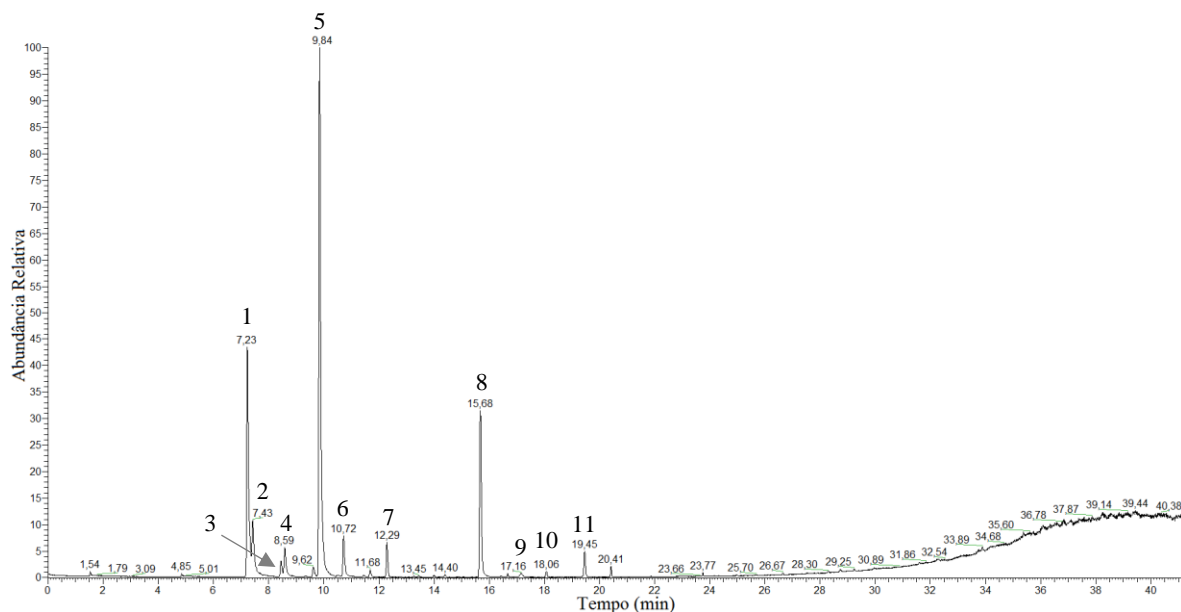


Figura 4.3 - Cromatograma do óleo com voláteis obtido por GC-MS de acordo com a metodologia descrita em 3.2.2 através de SPME.

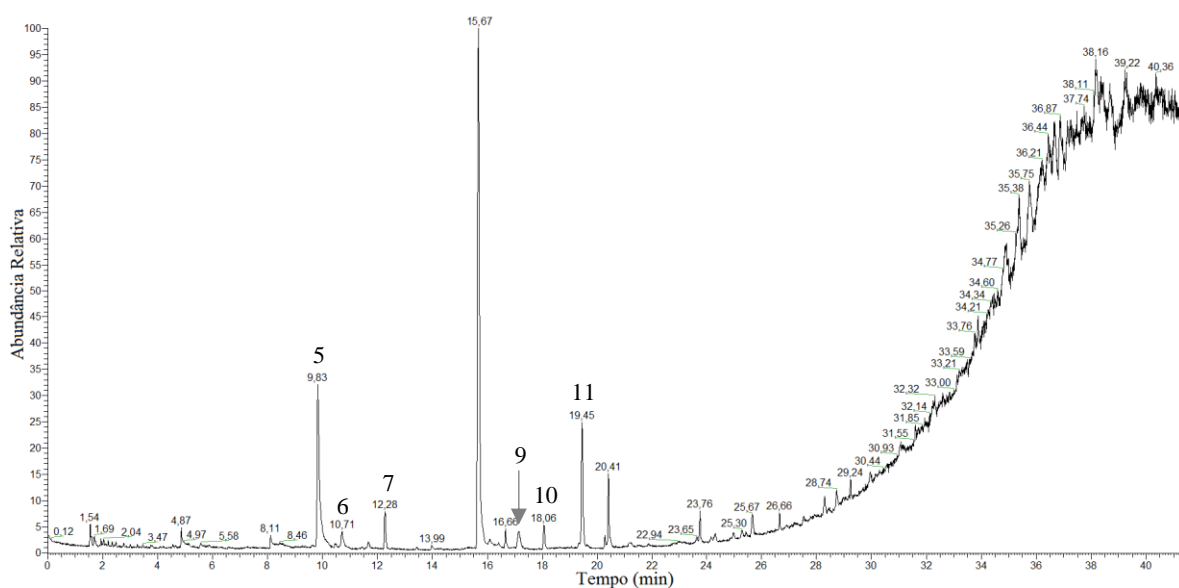


Figura 4.4 - Cromatograma do óleo sem voláteis obtido por GC-MS de acordo com a metodologia descrita em 3.2.2 através de SPME.

Tabela 4.2 - Identificações dos picos numerados nos cromatogramas do óleo com e sem voláteis através de SPME (**Figura 4.3** e **Figura 4.4**, respectivamente) de acordo com os espectros de massa (Anexo A), bem como a comparação entre ambos.

ID	Óleo com voláteis	Óleo sem voláteis
1	α -tujeno	Não presente
2	α -pineno	Não presente
3	sabineno	Não presente
4	3-careno	Não presente
5	cimeno (orto/para)	Muito diminuído
6	γ -terpineno	Muito diminuído
7	hidrato de trans-sabineno	Diminuído
8	timoquinona	Diminuído
9	timol	Idêntico
10	α -longipineno	Idêntico
11	longifoleno	Idêntico

Comparando os dois cromatogramas, foi possível constatar que os compostos com maior abundância relativa nos vapores libertados pelo óleo com voláteis (**Figura 4.3**) são o cimeno (ID 5), α -tujeno (ID 1), e a timoquinona (ID 8), no entanto para o óleo sem voláteis foi evidente uma diminuição substancial da abundância relativa no geral de todos os picos (**Figura 4.4**) exceto para o timol (ID 9), o α -longipineno (ID 10) e longifoleno (ID 11). Com esta análise complementar, comprova-se que no óleo sem voláteis os compostos α -tujeno (ID 1), α -pineno (ID 2), sabineno (ID 3) e 3-careno (ID 4) foram efetivamente retirados da matriz do óleo após o tratamento e que o cimeno (ID 5), sofreu uma redução substancial na sua abundância relativa tal como o γ -terpineno (ID 6).

Foi notório para além da perda de compostos voláteis através de espectrometria de massa, que o óleo perde também o seu aroma característico quando sujeito ao tratamento e lhe são retirados os compostos mais voláteis.

Depois de garantida a remoção dos compostos mais voláteis foram testadas as várias atividades biológicas frequentemente referenciadas para o óleo da *Nigella sativa* ambos os óleos (com e sem voláteis).

4.2 Quantificação de fenóis totais

Para a quantificação dos fenóis totais foi utilizado o método descrito em “3.2.4 Quantificação de fenóis totais”. Depois da análise feita em óleo com e sem voláteis foram obtidos os valores de fenóis totais presentes na **Figura 4.5**.

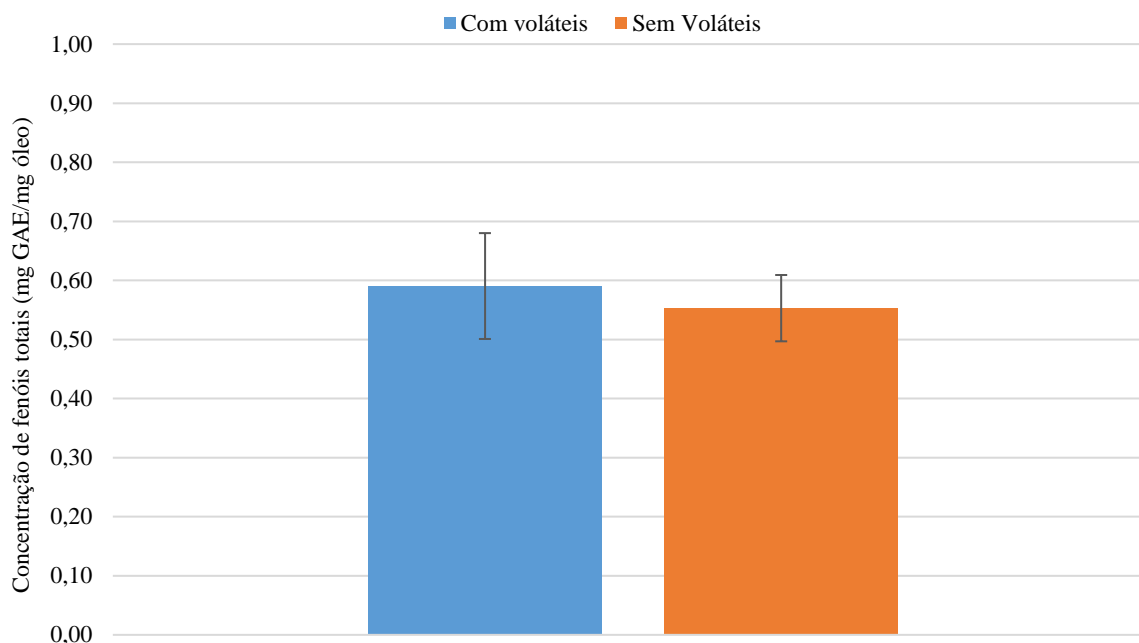


Figura 4.5 - Quantificação de fenóis totais para o óleo com e sem voláteis.

Obteve-se uma quantificação de fenóis totais de $0,59 \pm 0,09$ e $0,55 \pm 0,06$ mg GAE/mg óleo para o óleo com voláteis e sem voláteis, respetivamente. A diferença entre os valores de fenóis totais para o óleo com e sem voláteis não é significativa, no entanto, faz sentido que o óleo sem voláteis tenha uma quantidade ligeiramente mais baixa, uma vez que, compostos fenólicos que não foram identificados podem ter sido removidos da matriz.

Em comparação, o valor reportado na literatura $1,744 \pm 0,010$ µg/mg óleo⁷⁷ é significativamente mais baixo comparando com o valor obtido, no entanto, as diferenças podem dever-se ao facto de este ter sido quantificado por uma metodologia diferente.

Para além do método diferente, a proveniência das sementes pode influenciar a quantidade de fenóis contidos no óleo.

4.3 Atividade Antioxidante

Para a determinação da atividade antioxidante do óleo com e sem voláteis utilizou-se o método descrito em “3.2.5 Atividade antioxidante”. Na **Figura 4.6** são apresentados os resultados da percentagem de atividade antioxidante por captação do radical DPPH[•] para diferentes concentrações estudadas de ambos os óleos.

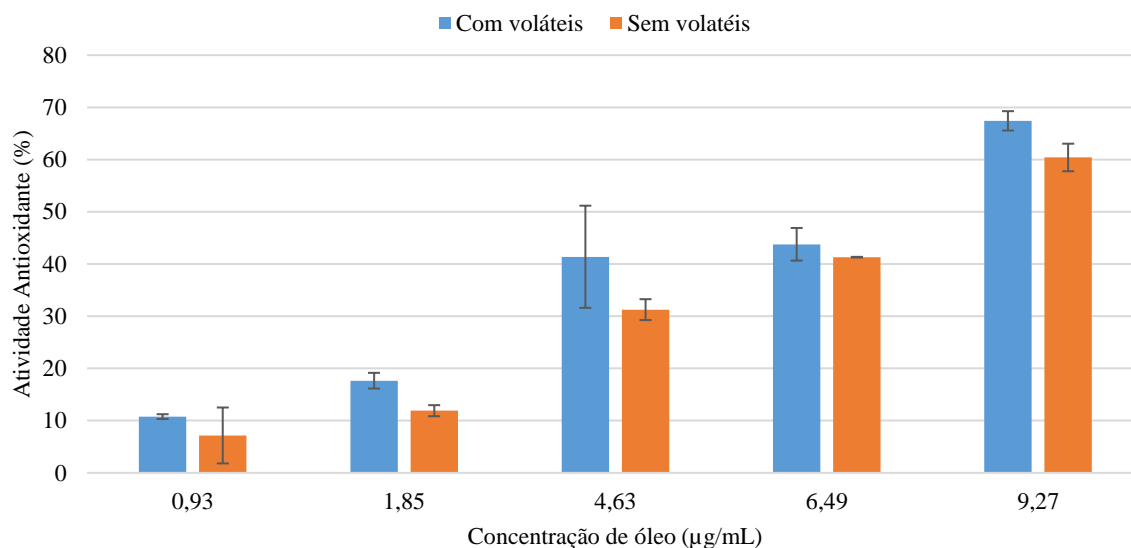


Figura 4.6 - Atividade antioxidante das diferentes concentrações de óleo com e sem voláteis, determinada de acordo com o procedimento descrito em 3.2.5.

Pode constatar-se em ambos os casos o aumento da atividade antioxidante com concentrações crescentes do óleo. No entanto, torna-se evidente que para o óleo sem voláteis o aumento não é tão acentuado quanto para o óleo com voláteis. Com os valores obtidos foi ainda possível determinar o EC₅₀ do óleo de sementes de *N. sativa*, sendo que foi obtido $6,74 \pm 0,57 \mu\text{g/mL}$ e $7,71 \pm 0,30 \mu\text{g/mL}$ para o óleo com voláteis e sem voláteis, respetivamente. Segundo a análise estatística 2way ANOVA, obteve-se um valor de $P < 0,0001$, que significa que a diferença entre o óleo com e sem voláteis é significativa, tal como as diferenças entre concentrações.

O óleo com voláteis apresenta uma atividade antioxidante ligeiramente melhor do que sem voláteis, o que faz sentido uma vez que, ao retirar os compostos mais voláteis do óleo, como descrito em “3.2.2 Preparação das amostras de óleo sem voláteis”, pode haver a perda de alguns compostos que têm atividade antioxidante. Ainda assim, o óleo com e sem voláteis tem um EC₅₀ muito próximo, o que faz sentido uma vez que o composto que está fortemente associado à atividade antioxidante da *N. sativa* é a timoquinona que, segundo a análise realizada em GC-MS, foi apenas minimamente removida da matriz do óleo.^{14,15}

Na literatura existem também estudos da atividade antioxidante do óleo. Num desses casos o EC₅₀ é $460 \mu\text{g/mL}$ ²², o que é uma diferença enorme comparado com os resultados obtidos, no entanto, neste estudo, é utilizada uma extração do óleo. Neste estudo, as sementes de *Nigella sativa* foram compradas em Linz, Áustria. Existe ainda o estudo da capacidade antioxidante das sementes de *N. sativa* em diferentes regiões da Turquia, aqui não é calculado o EC₅₀, mas sim determinada a atividade antioxidante em diferentes concentrações para cada origem das sementes.²⁸ As atividades variam entre cerca de 44% (Konya) e 26% (Burdur) para a concentração mais alta em estudo ($0,5 \text{ mg/mL}$)²⁸. Isto mostra que mesmo em zonas relativamente próximas geograficamente a diferença pode ser grande, o que pode explicar a diferença entre o EC₅₀ experimental e o da literatura.

Os resultados obtidos permitem concluir que tanto o óleo com e sem voláteis exibem uma elevada atividade antioxidante que poderá ser atribuída à timoquinona (ID 8) presente em ambos.^{14,15}

Posto isto, o óleo pode ser uma boa alternativa para a indústria alimentar como um antioxidante natural, visto que o BHT apresenta um $EC_{50} = 23,7 \mu\text{g/mL}$, ou seja, o óleo aparenta ter mais atividade antioxidante que um dos compostos mais usados industrialmente.⁸⁴

4.4 Inibição da peroxidação lipídica

Foi também determinada a capacidade de inibição da peroxidação lipídica através do método descrito em “3.2.6 Inibição da peroxidação lipídica”. Os resultados são apresentados na **Figura 4.7**.

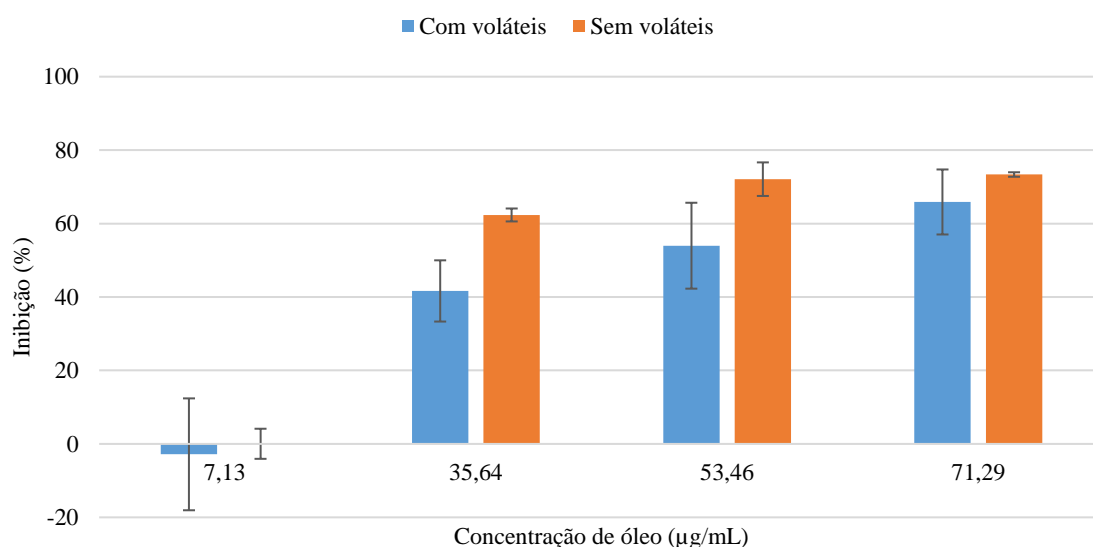


Figura 4.7 - Inibição da peroxidação lipídica das diferentes concentrações de óleo com e sem voláteis, determinada de acordo com o procedimento descrito em 3.2.6.

A observação da **Figura 4.7** permite reconhecer que ocorre um efeito inibitório dependente da dose, isto é, na presença de concentrações crescentes do óleo com e sem voláteis ocorre o aumento da capacidade de inibir a peroxidação lipídica. No entanto, torna-se evidente que para o óleo sem voláteis o aumento é maior que para concentrações crescentes de óleo com voláteis. Os valores de IC_{50} obtidos para o óleo com e sem voláteis foram $51,77 \pm 5,17$ e $40,18 \pm 0,47 \mu\text{g/mL}$, respetivamente. Para os valores obtidos foi feita uma *2way ANOVA*, onde se obteve um valor de $P < 0,0001$ para as diferentes concentrações, o que significa que é significativa a diferença e um $P < 0,005$ para as diferenças entre o óleo com e sem voláteis, o que mostra que também estas diferenças são significativas. Nota-se desde logo uma tendência diferente do observado para os outros ensaios de bioatividade. O óleo sem voláteis aparenta ter uma atividade inibitória da peroxidação lipídica ligeiramente mais elevada que o óleo com voláteis. Isto pode indicar que os compostos responsáveis por esta inibição não foram retirados da matriz do óleo como o timol (ID 9). Este é um composto que apresenta capacidade inibitória da peroxidação lipídica, como tal, é possível que seja este o responsável pela atividade do óleo, e o facto de serem removidos muitos dos compostos voláteis, no óleo sem voláteis, algum destes pode ter uma interação antagonista com o timol, neste caso, a atividade do óleo iria aumentar com a remoção dos voláteis.^{85,86}

Na bibliografia, apesar de a atividade não ser quantificada de nenhuma metodologia idêntica, sabe-se que o óleo das sementes de *Nigella sativa* tem atividade contra a peroxidação lipídica.^{87,88} E apesar da timoquinona ser vista como o composto antioxidante do óleo,^{14,15} a sua diminuição no óleo sem voláteis,

em comparação ao óleo com voláteis, não parece ter influência nesta atividade, o que pode indicar que a timoquinona não é o composto responsável pela inibição da peroxidação lipídica.

4.5 Inibição da atividade da HMGCR

Foram feitos ensaios preliminares para a determinação da capacidade do óleo com e sem voláteis de inibir a atividade da HMGCR. Seguiu-se o procedimento descrito em “3.2.7 Inibição da atividade da HMGCR”. A utilização do *kit* permitiu fazer um teste preliminar acerca da potencial atividade inibitória do óleo, já que este é reportado para a redução de colesterol e utilizado na medicina tradicional.¹⁰

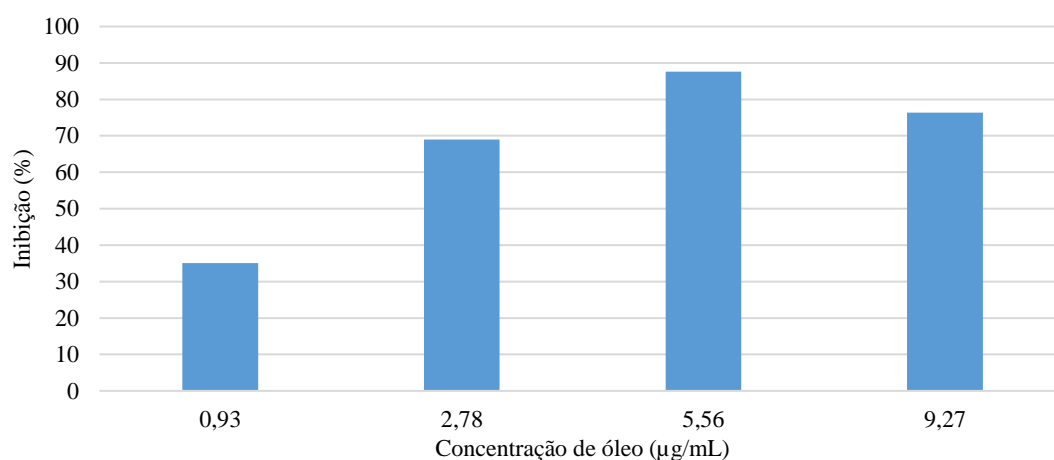


Figura 4.8 - Inibição da atividade da HMGCR para as diferentes concentrações de óleo com voláteis.

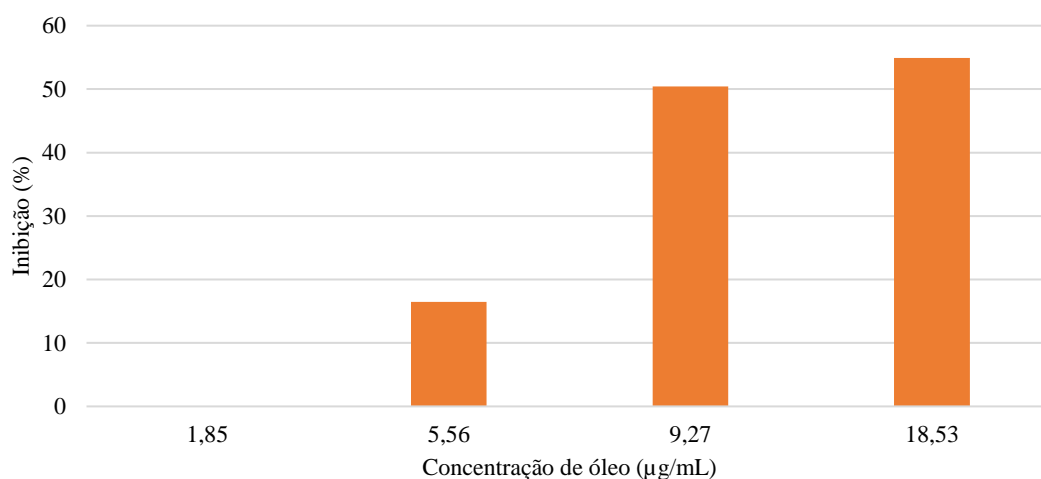


Figura 4.9 - Inibição da atividade da HMGCR para as diferentes concentrações de óleo sem voláteis.

Nas figuras acima, são apresentados os resultados da inibição da HMGCR para o óleo com voláteis (**Figura 4.8**) e sem voláteis (**Figura 4.9**). Pode constatar-se que, para o óleo com voláteis, a concentração de 5,56 µg/mL, tem uma atividade inibitória de cerca de 90%, e parece chegar a um patamar nessa concentração. Quanto ao óleo sem voláteis, a mesma concentração (5,56 µg/mL), apresenta somente 16% de inibição, e a concentração mais elevada, 18,53 µg/mL, apresenta apenas uma inibição que ronda os 55%. Apesar de ser um teste preliminar, parece existir atividade no óleo com

voláteis, onde se estima que o IC_{50} esteja entre 0,85 e 1,83 $\mu\text{g/mL}$, e algum desse potencial perde-se após serem removidos os compostos mais voláteis da matriz do óleo, onde o IC_{50} se estima que esteja entre 9,64 e 16,87 $\mu\text{g/mL}$.

Na bibliografia, em testes feitos em ratos, é também observada uma atividade inibitória da enzima HMGCR.²⁴ Apesar de não haver qualquer referência a qual é o composto que possa estar a inibir a HMGCR, e visto que a inibição do óleo diminuiu muito com a remoção dos voláteis, é de constatar que o composto responsável por esta atividade poderá ser um que não seja completamente removido, mas que esteja diminuído, como o cimeno (ID 5), γ -terpineno (ID 6), hidrato de trans-sabineno (ID 7) ou a timoquinona (ID 8). O fármaco sinvastatina apresenta um IC_{50} de 0,2 $\mu\text{g/mL}$, e o óleo com voláteis um IC_{50} entre 0,85 e 1,83 $\mu\text{g/mL}$. Isto mostra que o óleo tem menos atividade que o fármaco, no entanto, visto que o óleo não é um composto puro, mas sim uma mistura natural de compostos, pode ser uma alternativa ao fármaco.⁸⁹

4.6 Inibição da atividade da AChE

A inibição da atividade da AChE foi estudada através do método descrito em “3.2.8 Inibição da atividade da AChE”. Os resultados obtidos neste estudo, para o óleo com e sem voláteis são apresentados na **Figura 4.10**.

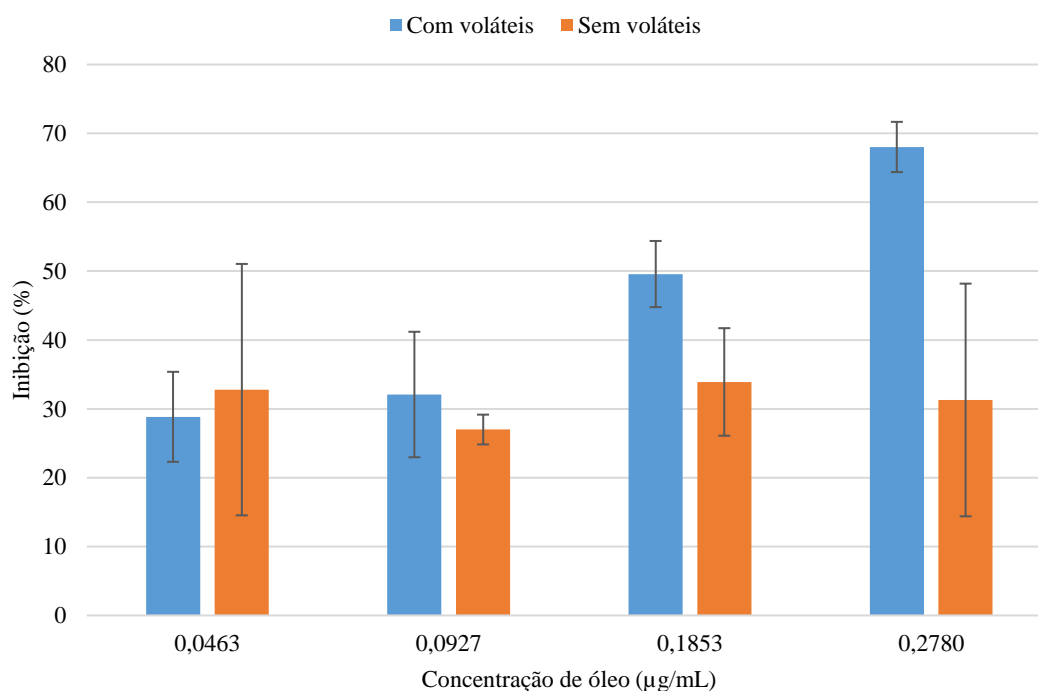


Figura 4.10 - Inibição da atividade da AChE para o óleo com e sem voláteis.

Para o óleo com voláteis nota-se que com o aumento da concentração existe um aumento de inibição da atividade enzimática. Para este caso conseguiu-se chegar ao valor de $IC_{50} = 0,1782 \pm 0,0206 \mu\text{g/mL}$. Em oposição, para o óleo sem voláteis houve uma redução na capacidade de inibição da atividade enzimática e os valores de inibição apresentaram-se constantes para concentrações crescentes de óleo. Estatisticamente, obteve-se um $P < 0,0001$ para o óleo com voláteis nas diferentes concentrações, o que significa que a atividade é dependente da concentração de óleo, o que se pode ver claramente na **Figura 4.10**. Para o óleo sem voláteis, a relação atividade vs concentração não é significativa, obtendo

um $P = 0,8853$, logo o óleo sem voláteis não apresenta variação na atividade inibitória da AChE às diferentes concentrações testadas. Ainda assim, em relação ao controlo, o óleo sem voláteis aparenta ter uma inibição constante de cerca de 30%, que pode estar relacionado com o facto de o óleo nunca ficar completamente miscível na mistura reacional, o que pode explicar também os desvios padrão extremamente elevados.

Sendo dos compostos identificados no óleo, o α -pineno (ID 2), reportado na bibliografia como um composto com atividade inibitória da AChE,⁹⁰ possivelmente, o responsável pela inibição do óleo, uma vez que quando os compostos mais voláteis são removidos, como referido anteriormente, o α -pineno é completamente retirado da matriz do óleo, o que leva a que o óleo sem voláteis apresente uma menor capacidade de inibição da atividade de AChE relativamente ao óleo com voláteis.

O donepezil, que é o fármaco mais utilizado na inibição da AChE, tem uma IC_{50} de 2,28 ng/mL,⁹¹ que apesar de ter uma maior atividade comparativamente com óleo, tem também muitos efeitos secundários.⁴⁷ Como tal, o óleo pode ser uma possível alternativa menos agressiva ao doente.

4.7 Citotoxicidade em células cancerígenas

Como referido em “1.3.3 Potencial farmacológico”, o óleo das sementes de *Nigella sativa* apresenta uma reconhecida capacidade anticancerígena.²³ Isto foi também verificado nos testes preliminares que foram realizados e inspiraram em parte o tema desta dissertação, como referido em “1.1 Problemática”. Os ensaios foram realizados em linhas celulares do cancro da mama (MCF-7) e do melanoma (A375), cancros estes contra os quais o óleo é referido como ter capacidade anticancerígena.²³

As células foram preparadas de maneira idêntica para todos os ensaios de ambas as linhas celulares (3.2.9.1 Crescimento celular), sendo depois a viabilidade celular das células em contacto com o óleo sem voláteis e o óleo com voláteis quantificada pelo ensaio colorimétrico do MTT, como descrito em “3.2.9.2 Ensaios de viabilidade celular”.

4.7.1 Células do cancro da mama (MCF-7)

Na **Figura 4.11** e **Figura 4.12** está representada a morte celular (%) quando as células são incubadas 24 h com diferentes concentrações de óleo com e sem voláteis, respetivamente. Na presença do óleo com voláteis existe um aumento claro na morte celular para crescentes concentrações. Com estes resultados foi possível calcular o LC_{50} de $1,64 \pm 0,38$ μ g/mL para o óleo com voláteis. Já para o óleo sem voláteis, nas mesmas concentrações em contacto com as células, não foi verificada morte celular, neste caso, a população celular aumentou em relação ao controlo, apesar dos grandes desvios padrão. Estatisticamente, obtém-se um $P < 0,0001$ para as diferentes concentrações do óleo com voláteis, o que mostra que a morte celular é dependente da concentração, ao contrário do óleo sem voláteis, que obteve um $P = 0,1624$, ou seja, não mostra dependência entre a morte celular e a concentração do óleo. Através da *2way-ANOVA*, obteve-se também um $P < 0,0001$ entre o óleo com e sem voláteis, ou seja, a diferença entre eles é significativa.

O objeto de estudo é o óleo das sementes de *Nigella sativa*, sementes estas que são utilizadas medicinalmente e gastronomicamente em locais como a Índia, Egipto e Síria.¹² Como visto anteriormente, as sementes de *N. sativa* contêm ácidos gordos, proteínas, fibras, vitaminas, entre outros⁷⁷, ou seja, contém um valor nutritivo, isto pode levar a que, se retirados os compostos tóxicos às

linhas celulares, como potencialmente, no caso do óleo sem voláteis, este óleo pode tornar-se noutra fonte nutritiva, ajudando assim o crescimento das linhas celulares.

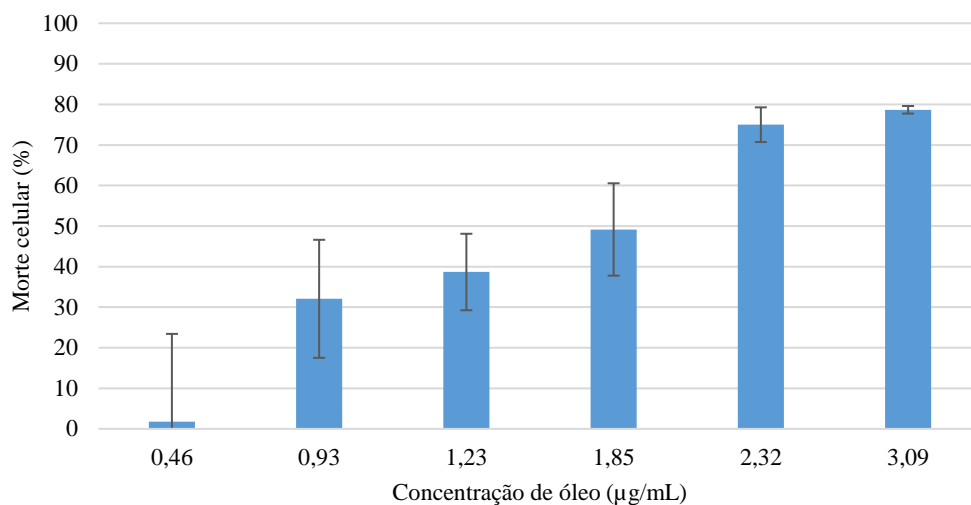


Figura 4.11 - Morte celular (%) da linha celular MCF-7 para diferentes concentrações de óleo com voláteis.

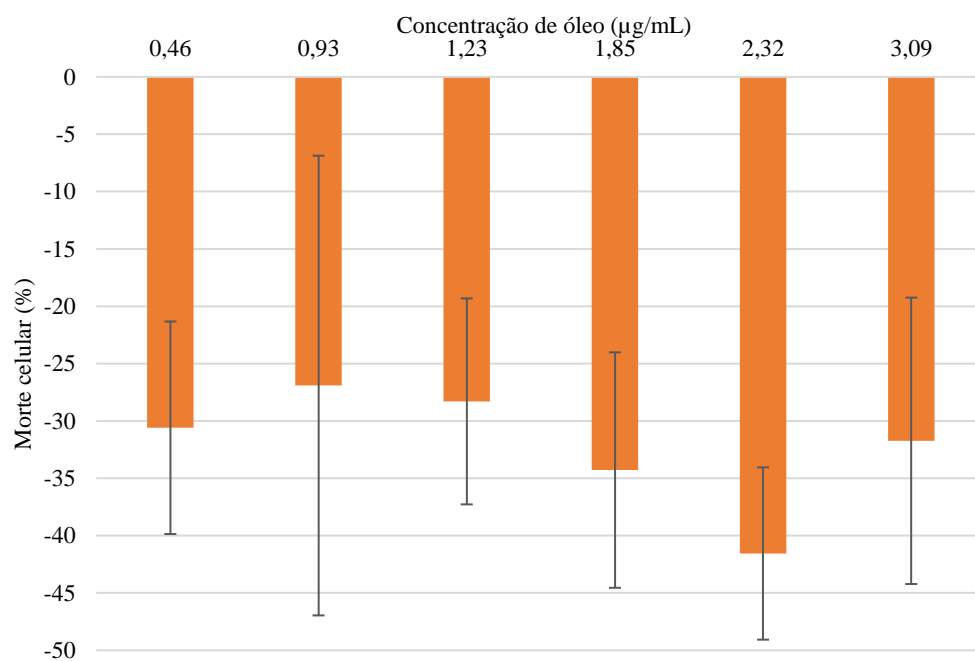


Figura 4.12 - Morte celular (%) da linha celular MCF-7 para diferentes concentrações de óleo sem voláteis.

4.7.2 Células do melanoma (A375)

Para a linha celular A375 em contacto com o óleo a diferentes concentrações obteve-se o gráfico apresentado na **Figura 4.13**.

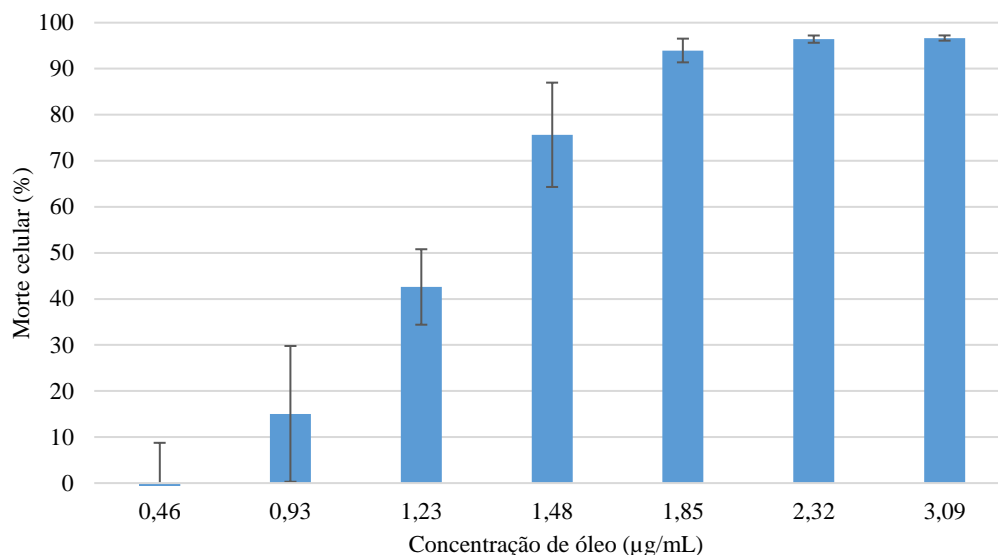


Figura 4.13 - Morte celular (%) da linha celular A375 para diferentes concentrações de óleo com voláteis.

Com esta gama de concentrações foi possível identificar a formação de um patamar, ou seja, onde a toxicidade máxima é atingida e a partir de que ponto a concentração se torna irrelevante em relação à morte celular, que parece ser a partir de 1,85 µg/mL. Focando na zona linear da gama de concentrações, foi possível obter um $LC_{50} = 1,28 \pm 0,08$ µg/mL.

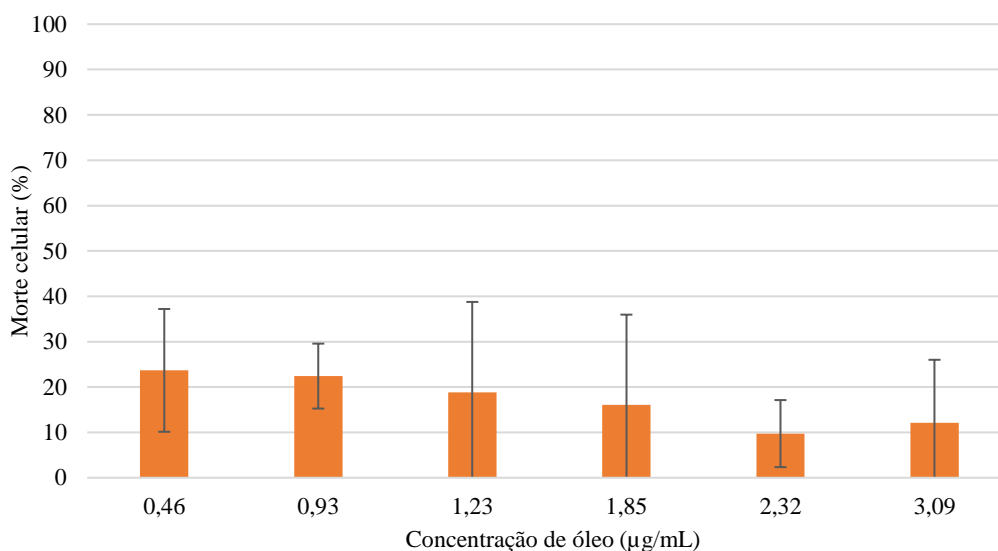


Figura 4.14 - Morte celular (%) da linha celular A375 para diferentes concentrações de óleo sem voláteis.

Para esta linha celular, o óleo sem voláteis aparenta não ter qualquer tipo de efeito ao longo das concentrações crescentes. Com a análise estatística, obteve-se um $P < 0,0001$ para o óleo com voláteis ao longo das concentrações. Através da *2way-ANOVA* obteve-se também um $P < 0,0001$ para a comparação entre óleo com e sem voláteis, sendo estes significativamente diferentes.

Comparando ambas as linhas celulares, nota-se que o óleo é mais eficiente contra as A375 em comparação com as MCF-7, uma vez que os valores de LC_{50} obtidos são $1,28 \pm 0,08 \mu\text{g/mL}$ e $1,64 \pm 0,38 \mu\text{g/mL}$ respetivamente. Para além disso, nota-se na **Figura 4.13** que a partir dos $2,32 \mu\text{g/mL}$ já há uma morte celular acima dos 95%, ao contrário da linha celular MCF-7, onde na concentração mais alta estudada, $3,09 \mu\text{g/mL}$, existe apenas cerca de 80% de morte celular, como pode ser visto na **Figura 4.11**. Esta diferença pode significar que as A375 são mais sensíveis às potencialidades do óleo do que as MCF-7, isto pode explicar também o facto de o óleo sem voláteis não ter qualquer tipo de efeito como visto na **Figura 4.14**, em comparação com a **Figura 4.12**, onde o óleo sem voláteis parece potenciar o crescimento da linha celular em questão.

O *p*-cimeno é reportado como citotóxico para algumas linhas celulares cancerígenas, como tal, é possível que seja este (cimeno (ID 5)) o composto responsável pela citotoxicidade observada, uma vez que, é removido do óleo (sem voláteis) quase na totalidade e este óleo perde completamente o seu potencial citotóxico contra estas linhas celulares cancerígenas.⁹²

Concluindo, o óleo apresenta um LC_{50} de $1,64 \pm 0,38 \mu\text{g/mL}$ e $1,28 \pm 0,08 \mu\text{g/mL}$ para as linhas celulares MCF-7 e A375, respetivamente. Segundo o Instituto Nacional do Cancro dos Estados Unidos da América (US NCI), um composto puro, é geralmente considerado como citotóxico se apresentar um IC_{50} de $4 \mu\text{g/mL}$ ou menos, em tempos de incubação entre 48 e 72 horas. Neste caso o estudo foi feito com uma incubação de 24 horas, ou seja, seria importante, no futuro, não só testar o óleo em linhas celulares não cancerígenas, como também aumentar o tempo de incubação. Assim, iria ser possível verificar se o óleo se mantinha citotóxico contra as linhas celular e se apresentava algum tipo de seletividade, não sendo tão tóxico para células não cancerígenas.⁹³

4.8 Estudo do perfil proteico (A375)

Este estudo permitiu analisar potenciais alterações no proteoma das células (A375) como consequência da presença do óleo no meio de cultura. Com este ensaio, foi possível identificar as alterações ao funcionamento normal das células que possivelmente resultam na sua morte celular.

Como explicado anteriormente, devido ao mais fácil manuseamento da linha celular A375 e sendo esta mais sensível ao efeito citotóxico do óleo, o estudo do perfil proteico foi feito apenas nesta linha celular. Depois de preparadas as células como descrito em “3.2.10.1 Preparação celular”, estas foram analisadas através de eletroforese em condições nativas que foi preparada como descrito em “3.2.10.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições nativas (PAGE-nativa)”.

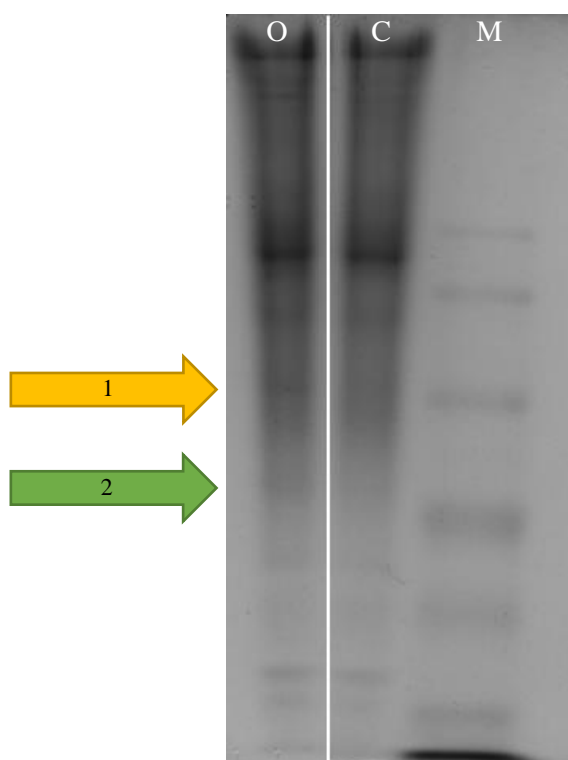


Figura 4.15 - Eletroforese PAGE nativa (7,5%); O – Proteínas da cultura celular A375 (30 µg) em contacto com a LC₅₀ do óleo durante 24 h; C – Proteínas da cultura celular controlo A375 (30 µg); M – Marcador de peso molecular NZYTech® Blue Protein Marker.

Na **Figura 4.15**, foi evidente no perfil de proteínas das células em contacto com o óleo (*lane* O), o aumento da intensidade de duas bandas de proteína que nas células controlo eram bastante mais ténues (*lane* C), na **Figura 4.15** estão assinaladas com setas 1 (amarela) e 2 (verde).

Para uma análise do gel de eletroforese mais perceptível, foi utilizado o *software* ImageJ para o processamento da imagem, os resultados da intensidade das bandas de proteína presentes em cada *lane* foram calculadas em função da distância de migração são apresentados na **Figura 4.16**.

Com este *software* é possível representar graficamente cada *lane* numa curva de perfil das bandas de *gray value* vs distancia de migração. O *gray value* corresponde à intensidade das bandas, ou seja, quanto mais intensa é a banda, mais escura se mostra na imagem e por consequente, mais elevado é o *gray value*. Na **Figura 4.16** apresenta-se o gráfico que corresponde à imagem processada da **Figura 4.15**, e tal como anteriormente assinaladas com as setas 1 (amarela) e 2 (verde), nota-se um aumento da intensidade (*gray value*) na mesma zona de migração para as *lanes* correspondentes às células em

contacto com o óleo relativamente ao ensaio controlo. Estas estão também assinaladas pelas caixas na **Figura 4.16** com 1 (amarelo) e 2 (verde).

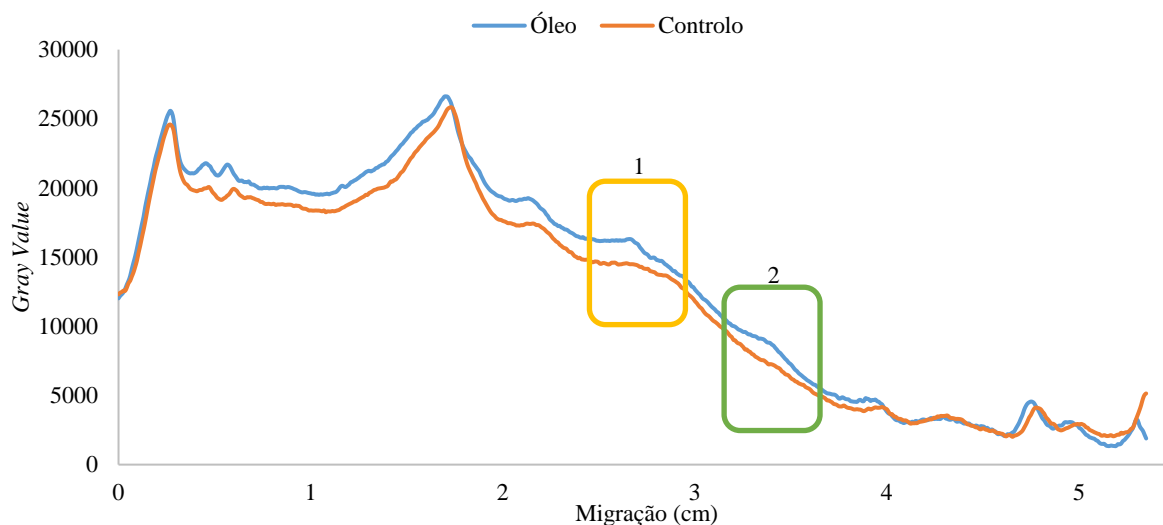


Figura 4.16 - Gráfico da média do *gray value* vs migração correspondente ao gel apresentado na **Figura 4.15**.

O *software* permitiu ainda relacionar a quantidade de proteína nas bandas 1 e 2 através do cálculo da área do pico correspondente à banda na curva de perfil das bandas. O que se constatou é que a proteína identificada como 1 (amarelo) aumentou nas células em contacto com o óleo cerca de 2 vezes para a mesma quantidade de proteína total analisada, enquanto que a proteína identificada como 2 (verde) aumentou aproximadamente 6 vezes relativamente às células controlo.

Depois de confirmada a diferença entre células com óleo e o controlo (sem óleo), foi estimado o peso molecular correspondente às bandas em questão (1, amarela e 2, verde). Para tal, utilizou-se o marcador (*lane M* da **Figura 4.15**). Foi estimado 108 kDa e 81 kDa para o tamanho aproximado das proteínas presentes nas bandas 1 e 2, respetivamente.

Estas proteínas foram excisadas do gel PAGE nativa e identificadas pela Unidade de Espetrometria de Massa do Instituto de Biologia Experimental e Tecnológica (IBET) por MALDI-TOF/TOF. No relatório (**Figura 4.17**), estão os resultados da identificação das proteínas (*Protein hits*) presentes nas bandas, as respetivas massas moleculares relativas (*Mr*), os péptidos obtidos por digestão com tripsina identificados e a percentagem de sequência coberta.

Gel bands	Protein hits	Nominal mass (M _r)	Protein Score	Sequence Coverage (%)	Identified peptides
RP_1	7 th POTE ankyrin domain family member F	121367	111	19	R.AAWWGKVPK.D, R.AVFPSIVGRPR.Q, K.EIAALAPSMKIR.I, K.LHRAAWWGKVPK.K, K.IWHHTFYNELR.V, R.LELDTMKHQSQLR.E, K.NKHGLTPLLGVHEQK.Q, K.SYELPDGQVITIGNER.F, K.QMLKISSSENSPEQDLK.L, K.QIEVVEKMNSELSCK.K, K.QMPKYSSSENSPEQDLK.L, K.QKRTALHLASANGNSEVVK.L, K.EKQMPKYSSSENSPEQDLK.L, K.SRTPENQQFPDNESEYHR.I, K.DLYTNTVLSGGTTMYPGMAHRMQK.E
RP_2	13 th Heat shock protein HSP 90-beta	83212	85	25	R.ALLFIPR.R, R.APFDFLENK.K, R.RAPDFLENK.K, R.ELISNASDALDK.I, R.APFDFENKKK.K, K.HFSVEGQLEFR.A, R.GVVDSDELPLNISR.E, K.ELKIDIIPNPQER.T, K.IRYESLTDPSKLDGK.E, K.KHLEINPDHPIVETLR.Q, K.EIFLRELISNASDALDK.I, R.ALLFIPRRAPDFLENK.K, K.HNDDEQYAWESSAGGSFTVR.A, R.VFIMDSCELIPEYLNFR.G, R.ELISNASDALDKIRYESLTDPSK.L, R.GVVDSDELPLNISREMLQSKILK.V, K.RGFEVVMTEPIDEYCVQQLKEFDGK.S

Note: Protein score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event. Protein scores greater than 56 are significant ($p < 0.05$). Protein scores are derived from ion scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits.

Figura 4.17 - Resultados da identificação das proteínas.

As proteínas identificadas foram a POTE anquirina, membro da família de domínio F para a banda 1 e a proteína de choque térmico HSP 90-β para a banda 2. Estas identificações correspondem à

identificação número 7 e 13 respetivamente das proteínas, visto que correspondem aproximadamente à massa molecular relativa aproximada por PAGE nativa e para além disso obteve-se um *protein score* elevado. Aqui, e como pode ser visto na nota da figura, um *score* acima da 56 é considerado significativo. Para estes casos foi obtido um *score* de 111 e 85, respetivamente.

A proteína 1 foi identificada como o membro F da família de domínios anquirinas, que são proteínas mediadoras da interação entre proteínas, com aproximadamente 120 kDa, esta proteína existe como proteína de fusão POTE-actina e cuja elevada expressão foi já associada à apoptose.⁹⁴ Adicionalmente na identificação feita, a proteína que apresentou maior *score* foi a actina citoplasmática cuja massa molecular relativa é aproximadamente 41,8 kDa que é uma proteína componente do citoesqueleto mediadora da mobilidade intracelular. Cada vez há mais evidências associando a actina à apoptose, apesar do mecanismo ainda não ser totalmente compreendido, neste caso que em células apoptóticas os níveis de actina são reportados como elevados sendo que a actina pode contribuir para a iniciação da apoptose.⁹⁵⁻⁹⁷

A proteína 2 foi identificada como uma proteína de choque térmico HSP 90- β , estas proteínas são expressas em elevado nível quando as células são sujeitas a stresse celular, como choque térmico, compostos tóxicos ou alguma alteração no ambiente celular e, para além de outras funções celulares pode associar-se à actina.^{98,99}

O aumento da expressão destas proteínas pode sugerir que o óleo leva as células cancerígenas a iniciar o mecanismo de apoptose, sendo que as células quando na presença do óleo como mecanismo de defesa, aumentam a expressão de proteínas como a HSP 90- β devido à presença de compostos já referidos anteriormente que exibem as bioatividades. Deste modo pode-se propor que as células A375 em contacto com o óleo estão a ser eliminadas por apoptose e sujeitas a stresse celular o que poderá explicar a morte celular.

4.9 Estudo da estrutura proteica em contacto com os voláteis do óleo através de FTIR

A técnica de espectroscopia de infravermelho por Transformada de Fourier foi utilizada de acordo com o procedimento descrito em 3.2.11, para complementar a análise das proteínas das células A375 sujeitas à ação do óleo. A espectroscopia de FTIR baseia-se nas vibrações dos átomos de moléculas que resultam numa alteração do momento dipolar das moléculas e no facto das ligações químicas apresentarem frequências específicas às quais vibram a níveis de energia bem definidos, permitindo identificar os grupos funcionais presentes nas moléculas.¹⁰⁰

A espectroscopia FTIR é uma ferramenta que permite a análise da estrutura de proteínas em diferentes meios a partir da análise das bandas que são devidas à vibração do esqueleto peptídico da proteína. As bandas devem-se ao *stretching* (alongamento) e *bending* (dobramento) de certas ligações químicas, presentes nos aminoácidos. Estas bandas têm o nome de amida e dependendo do número de onda a que se encontram são ainda enumeradas, existe da amida I até à amida VII e ainda a amida A e amida B.^{101,102}

As frequências de maior interesse na análise estrutural das proteínas são a amida I e amida II.¹⁰⁰ A amida I corresponde principalmente ao *stretch* do carbonilo a cerca de 1650 cm^{-1} e a amida II, ao *bend* da ligação N-H a cerca de 1550 cm^{-1} . A região da amida I é utilizada com frequência para determinar a estrutura secundária da proteína. A amida I tem certas zonas de número de onda que correspondem a diferentes motivos estruturais, hélices- α encontram-se entre 1648 e 1657 cm^{-1} e folhas- β entre 1612-1640 cm^{-1} . A amida II, no entanto, é muito menos sensível à conformação proteica, é por isso, analisada mais frequentemente a amida I.¹⁰⁰⁻¹⁰²

Alterações nas bandas amidas num espectro de infravermelho são geralmente devidas a modificações na estrutura secundária das proteínas. No entanto, podem ocorrer pequenos desvios na frequência vibracional das amidas devidas a alterações das ligações de hidrogénio envolvidas nas ligações peptídicas. A espectroscopia vibracional é um dos poucos métodos que permite a avaliação direta da força dessas ligações de hidrogénio.¹⁰³

O óleo de *Nigella sativa* demonstrou ser citotóxico tanto para células do cancro da mama (MCF-7), bem como para as do melanoma (A375) para além disso inibiu a AChE, entre outras atividades. Como visto no ponto “4.8 Estudo do perfil proteico (A375)”, o óleo induziu algumas alterações ao nível proteico na linha celular do melanoma. Posto isto, a preparação celular obtida em “3.2.10.1 Preparação celular” das células controlo e das células em contacto com o óleo foram analisadas através de espectroscopia de FTIR para verificar se havia algum tipo de alteração no espectro celular quando na presença do óleo. Os espectros obtidos encontram-se na **Figura 4.18**.

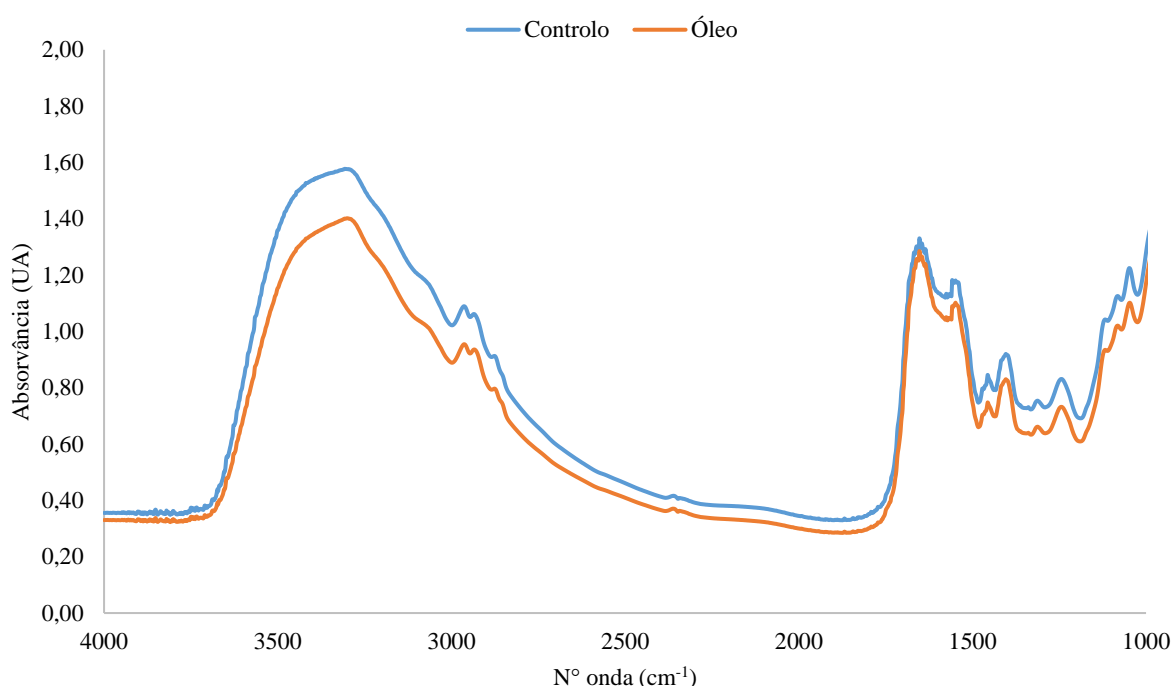


Figura 4.18 - Espectro de FTIR entre 4000 e 1000 cm^{-1} das amostras da linha celular A375 controlo e em contacto com o óleo, obtida como descrito em 3.2.10.1.

Como se pode ver na **Figura 4.18**, os espectros das células usadas como controlo em comparação com as células em contacto com o óleo são muito idênticos, não sendo possível verificar diferenças entre as duas amostras utilizando espectroscopia de FTIR. Isto poderá dever-se a que as alterações produzidas pelo óleo serem pequenas, o que foi constatado anteriormente no estudo das proteínas totais nas células por PAGE nativa e que revelou um aumento na expressão de apenas duas proteínas nas células em contacto com o óleo.

Deste modo, foi efetuado um estudo com duas proteínas para verificar se existiam alterações a nível da estrutura secundária destas em contacto com o óleo. Utilizaram-se duas proteínas como modelo e foi analisado por espectroscopia de FTIR as interações do óleo com a Albumina do Soro Bovino (BSA) e a Lisozima (Lys). Estas proteínas foram escolhidas por serem utilizadas como proteínas modelo, sendo a BSA utilizada por ser um bom modelo em geral, uma vez que não tem atividade enzimática e é barata, a Lys, devido ao facto de ser uma proteína modelo utilizada no estudo de amiloides, que estão relacionados, tal como a AChE, à doença de Alzheimer.¹⁰⁴

A **Figura 4.19** representa os espectros de FTIR obtidos de 1800 a 1400 cm^{-1} incluindo a região da amida I entre 1600 e 1700 cm^{-1} , o modo vibracional mais utilizado na análise da estrutura secundária de proteínas,¹⁰⁰ para as soluções de BSA controlo do ensaio sob agitação (BSA+A 0 h) e para a BSA na presença de óleo (BSA+OA 0 h). A **Figura 4.20** representa os espectros de FTIR na mesma região obtidos para as soluções de Lys controlo do ensaio sob agitação (Lys+A 0 h) e para a Lys na presença de óleo (Lys+OA 0 h).

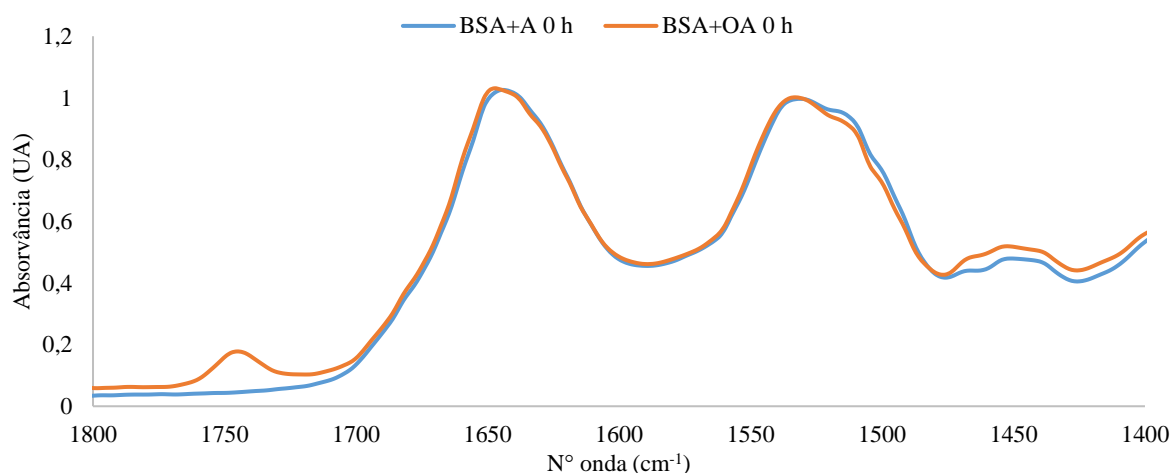


Figura 4.19 - Espectros de FTIR entre 1800 e 1400 cm^{-1} de BSA sob agitação (BSA+A 0 h) e BSA em contacto com o óleo sob agitação (BSA+OA 0 h), como descrito em 3.2.11.

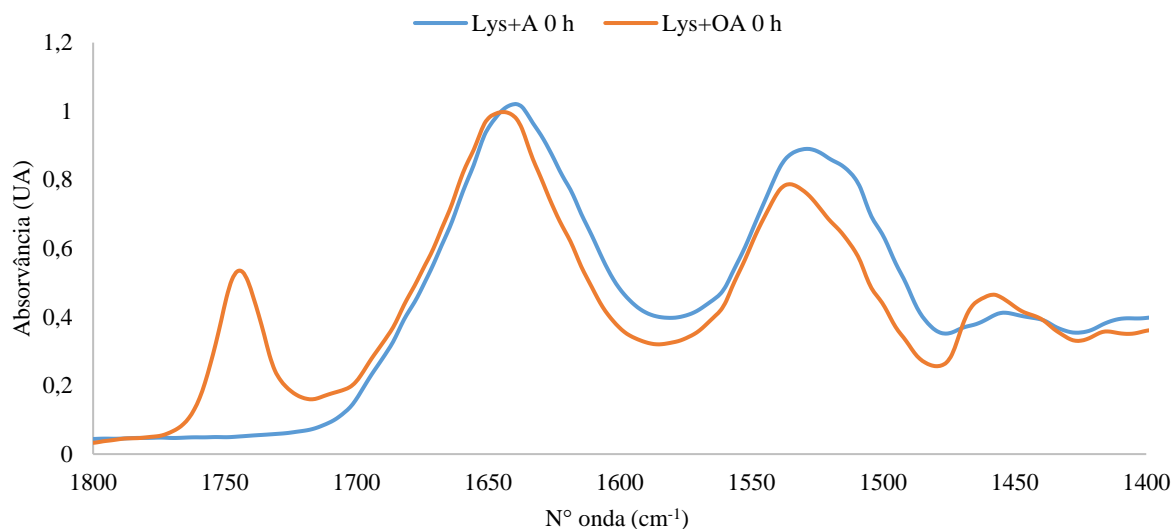


Figura 4.20 - Espectros de FTIR entre 1800 e 1400 cm^{-1} de Lys sob agitação (Lys+A 0 h) e Lys em contacto com o óleo e sob agitação (Lys+OA 0 h), como descrito em 3.2.11.

Tanto para a **Figura 4.19** como para a **Figura 4.20** o pico presente a cerca dos 1750 cm^{-1} (espectros laranja) indica a presença de óleo na mistura, tal como o pequeno aumento a cerca de 1450 cm^{-1} , estes picos correspondem, respetivamente, ao *stretch* do carbonilo e ao *bend* da ligação C-H de uma mistura lipídica, como é o caso do óleo de sementes de *Nigella sativa*.¹⁰⁵ É notório também na presença do óleo uma pequena deslocação da posição da banda da amida I da proteína para um número de onda maior no caso da BSA sendo mais evidente no caso da Lys. Os máximos da amida I da BSA+A 0 h e da Lys+A 0 h encontram-se a 1643 e 1639 cm^{-1} , respetivamente e no caso BSA+OA 0 h e Lys+OA 0 h, os máximos do pico desloca-se para números de onda superiores em 1647 e 1645 cm^{-1} , respetivamente, o que pode indicar uma diminuição da força das ligações de hidrogénio na presença do óleo sugerindo

interação entre o óleo e a proteína ou uma alteração estrutural na proteína como consequência da presença do óleo na mistura como solvente de carácter hidrofóbico.¹⁰⁶

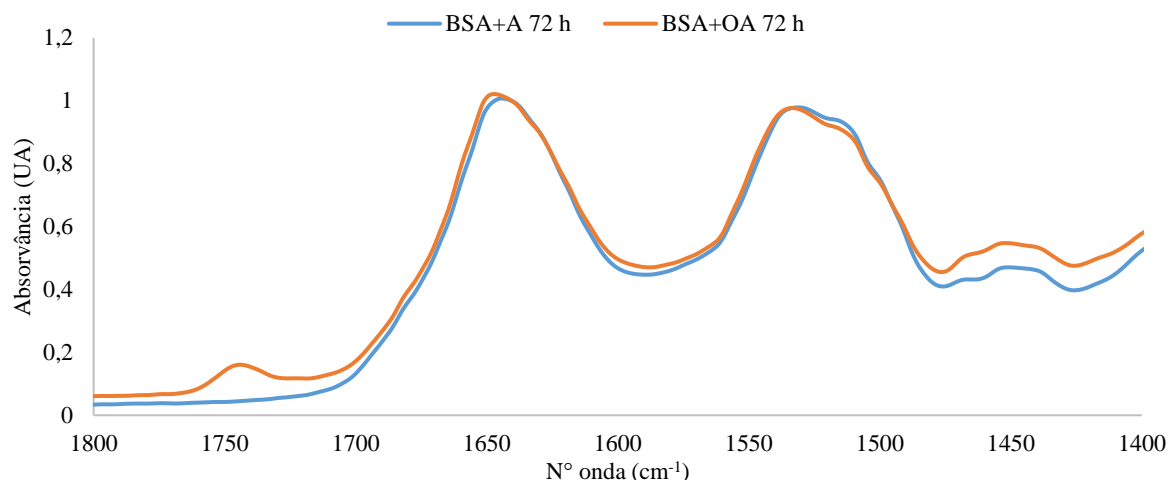


Figura 4.21 - Espectros de FTIR entre 1800 e 1400 cm^{-1} de BSA sob agitação durante 72 h (BSA+A 72 h) e BSA em contacto com o óleo e sob agitação durante 72 h (BSA+OA 72 h), como descrito em 3.2.11.

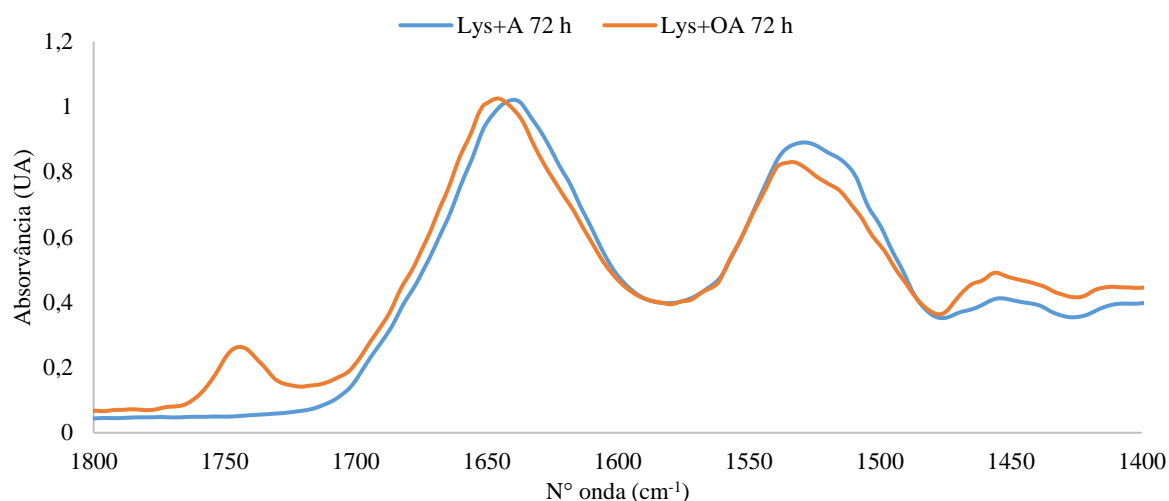


Figura 4.22 - Espectros de FTIR entre 1800 e 1400 cm^{-1} de Lys sob agitação durante 72 h (Lys+A 72 h) e Lys em contacto com o óleo e sob agitação durante 72 h (Lys+OA 72 h), como descrito em 3.2.11.

A **Figura 4.21** e a **Figura 4.22** representam os espectros de FTIR obtidos na região de 1800 a 1400 cm^{-1} para a solução de BSA e Lys em contacto com o óleo 72 h, sob agitação e respetivos controlos. Pode verificar-se novamente a presença do óleo (espectros laranjas) pela presença dos picos a cerca de 1750 e 1450 cm^{-1} . A solução de BSA+OA 72 h e Lys+OA 72 h apresentam ambas uma deslocação do pico máximo de absorção da banda amida I, esta variação é em tudo semelhante à verificada anteriormente (**Figura 4.19** e **Figura 4.20**).

De modo a esclarecer o efeito do óleo sobre as proteínas modelo, foi efetuado um estudo em que o óleo não estava misturado em solução com a proteína, mas sim colocado adjacente à solução de proteínas de modo a avaliar se os compostos voláteis emanados pelo óleo poderiam ter algum efeito sob as proteínas em estudo, considerando que os estudos anteriormente reportados tinham revelado, no geral, que os compostos voláteis presentes no óleo poderiam ser responsáveis pelas atividades biológicas reportadas. Na **Figura 4.23** e na **Figura 4.24**, estão representados os espectros de FTIR das proteínas após 24 h em contacto com os compostos voláteis do óleo (espectros laranjas, BSA+VT 24 h e Lys+VT 24 h) em

comparação com as proteínas sujeitas às mesmas condições na ausência de compostos voláteis do óleo (espectros azuis, BSA+T 24 h e Lys+T 24 h), para a BSA e Lys respetivamente.

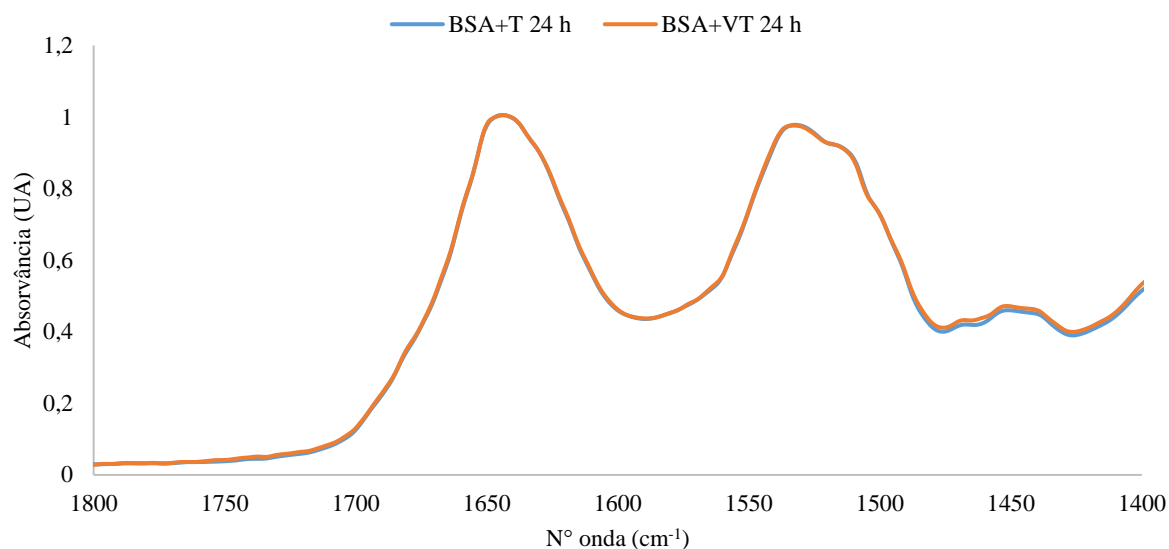


Figura 4.23 - Espectros de FTIR entre 1800 e 1400 cm^{-1} de BSA a 37 °C durante 24 h (BSA+T 24 h) e BSA em contacto com os voláteis a 37 °C durante 24 h (BSA+VT 24 h), como descrito em 3.2.11.

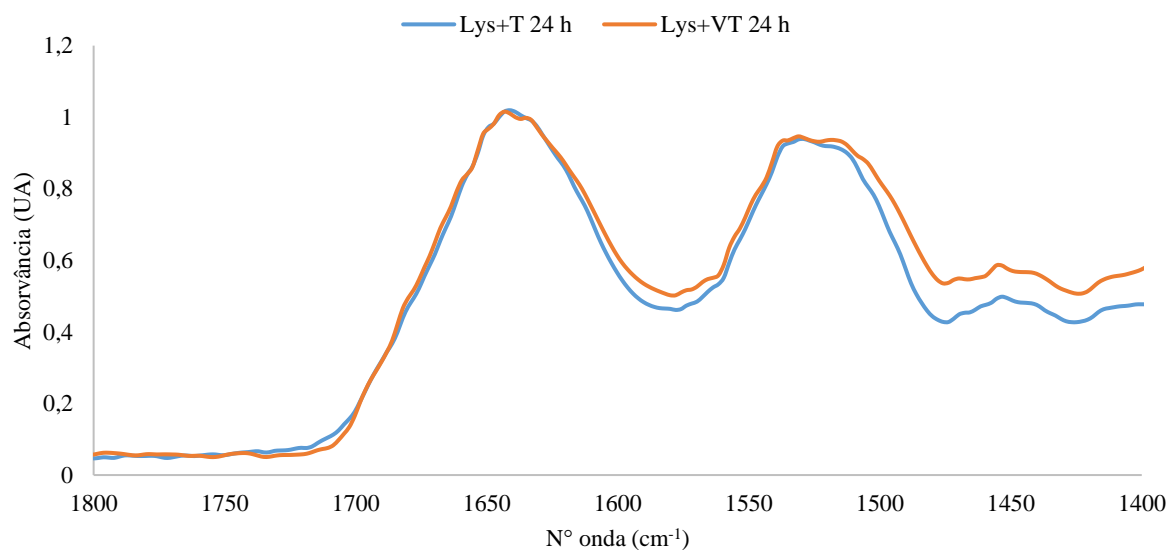


Figura 4.24 - Espectros de FTIR entre 1800 e 1400 cm^{-1} de Lys a 37 °C durante 24 h (Lys+T 24 h) e Lys em contacto com os voláteis a 37 °C durante 24 h (Lys+VT 24 h), como descrito em 3.2.11.

É notório que para a BSA (**Figura 4.23**) após as 24 horas os espectros contendo apenas BSA (BSA+T 24 h) comparado com o espectro de BSA com voláteis (BSA+VT 24 h) são sobreponíveis sugerindo que os compostos voláteis do óleo não alteram a conformação da BSA. Para a Lys, **Figura 4.24**, as alterações são muito pequenas entre o espectro da Lys (Lys+T 24 h) comparativamente com o espectro da Lys (Lys+VT 24 h) em contacto com os compostos voláteis do óleo. Foi, no entanto, visível que a banda da amida I ficou um pouco mais estreita no caso do espectro da Lys+T 24 h em comparação com o espectro da Lys+VT 24 h.

Na **Figura 4.25** e na **Figura 4.26**, estão representados os espectros de FTIR das proteínas após 72 h em contacto com os compostos voláteis do óleo (espectros laranjas, BSA+VT 72 h e Lys+VT 72 h) em

comparação com as proteínas sujeitas às mesmas condições na ausência de compostos voláteis do óleo (espectros azuis, BSA+T 72 h e Lys+T 72 h), para a BSA e Lys respetivamente. Após as 72 horas, os espectros correspondentes à BSA em ambas as condições mantêm-se iguais, sendo que os da Lys apresentam uma maior diferença. Aparentemente, a tendência referida anteriormente foi mantida, isto é, o espectro da BSA não sofreu alterações, mas foi evidente o estreitamento da banda da amida I no espectro da Lys controlo (Lys+T 72 h) em comparação com o espectro da Lys com os voláteis (Lys+VT 72 h).

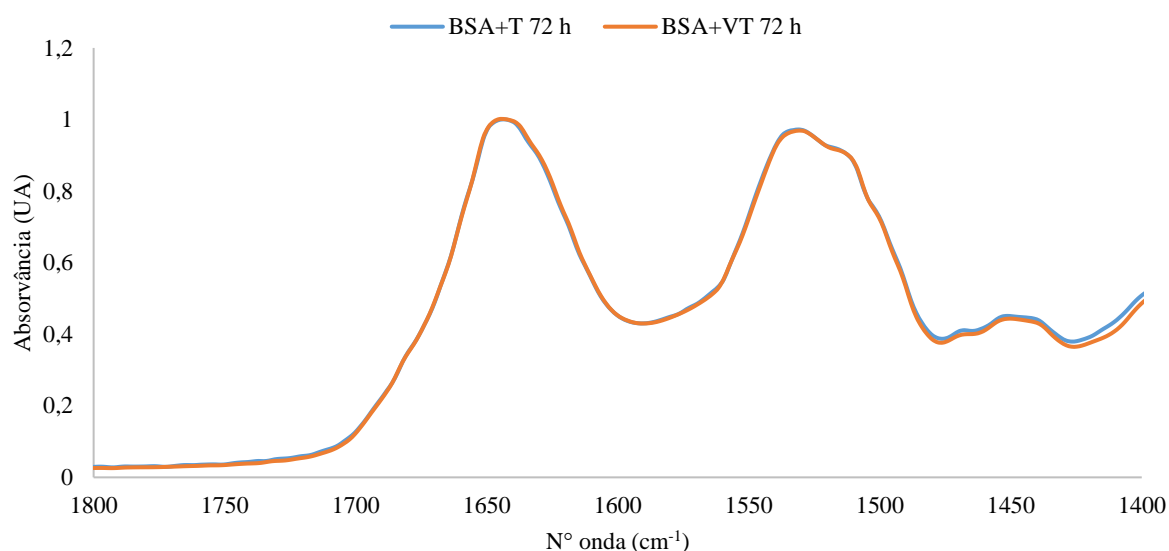


Figura 4.25 - Espectros de FTIR entre 1800 e 1400 cm^{-1} de BSA a 37 °C durante 72 h (BSA+T 72 h) e BSA em contacto com os voláteis a 37 °C durante 72 h (BSA+VT 72 h), como descrito em 3.2.11.

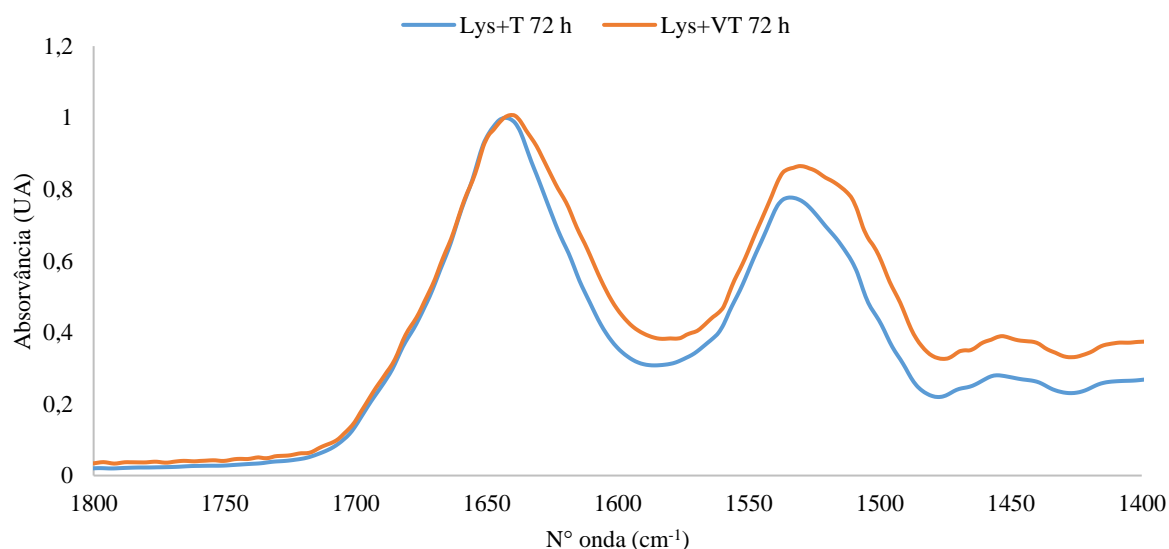


Figura 4.26 - Espectros de FTIR entre 1800 e 1400 cm^{-1} de Lys a 37 °C durante 72 h (Lys+T 72 h) e Lys em contacto com os voláteis a 37 °C durante 72 h (Lys+VT 72 h), como descrito em 3.2.11.

Depois de apresentados todos os espectros dos testes realizados, a única coisa que se pôde concluir com alguma certeza é que se ocorreu alguma alteração estrutural das proteínas modelo nas condições em estudo, essas alterações foram pequenas e por isso, muito difíceis de analisar por comparação dos espectros de FTIR, como tal, os espectros foram sujeitos a uma análise mais aprofundada.

Sabendo que a banda da amida I é constituída por várias bandas que se sobrepõem, formando assim uma única banda, existem intervalos de números de onda que são característicos de cada motivo

estrutural da proteína, como referido anteriormente. Cada motivo estrutural tem um intervalo de frequência onde a sua absorvância é maior, assim, e baseado na literatura, o número de onda 1622 cm^{-1} pode ser atribuído à contribuição das folhas- β presentes na estrutura secundária da proteína e o 1651 cm^{-1} às hélices- α .¹⁰⁷ Sabendo isto, foi feito o rácio dos valores da absorvância aos números de onda $1622/1651$, correspondendo ao rácio entre os componentes estruturais folhas- β /hélices- α ¹⁰⁷, isto permitiu avaliar a contribuição destes componentes para a estrutura da proteína quando sujeita às diferentes condições. Para todos os espectros apresentados anteriormente, foi feito este rácio, que é apresentado na **Figura 4.27**.

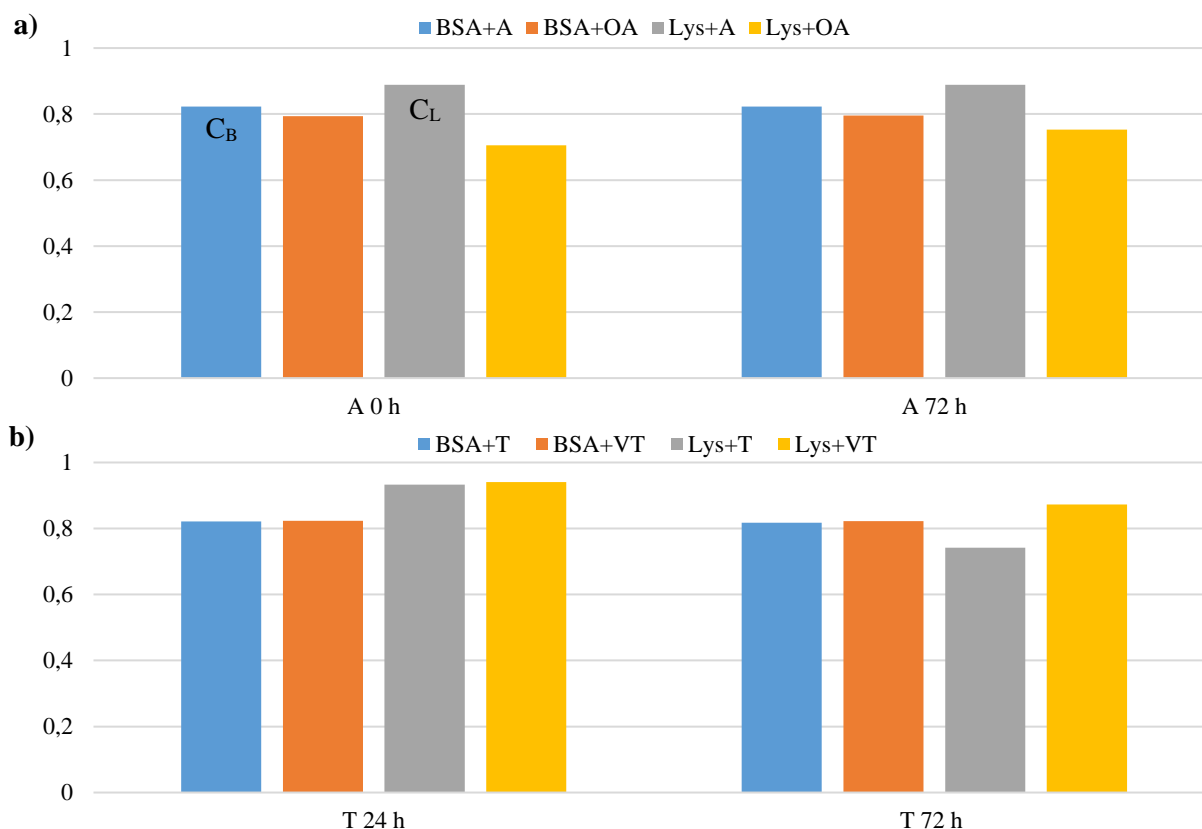


Figura 4.27 - Rácios $1622/1651$ de todos os espectros apresentados. **a)** corresponde aos rácios dos espectros que estiveram sob agitação 0 h e 72 h, tanto da proteína em contacto com o óleo (BSA+OA e Lys+OA) bem como dos respetivos controlos (BSA+A e Lys+A). **b)** corresponde aos rácios dos espectros que estiveram sob temperatura 24 h e 72 h, tanto da proteína em contacto com os voláteis (BSA+VT e Lys+VT) bem como dos respetivos controlos (BSA+T e Lys+T). C_B e C_L correspondem ao rácio da proteína com a sua estrutura nativa da BSA e Lys, respetivamente.

Através de alguma pesquisa na bibliografia¹⁰⁸ e na base de dados UniProt®, sabe-se que tanto a BSA como a Lys têm uma maior percentagem de hélices- α do que de folhas- β . No entanto, a Lys é composta por maior percentagem de folhas- β do que a BSA, e como tal o rácio $1622/1651$ deverá ser menor para a BSA (barras azuis e laranjas) em comparação com a Lys (barras cinza e amarelas). O que se constatou acontecer para os rácios de BSA+A 0 h e Lys+A 0 h que correspondem às proteínas na sua estrutura nativa (assinalados com um C_B e C_L, respetivamente), servindo assim de controlo para toda esta análise de rácios, uma vez que nestas amostras, a solução de proteína foi apenas ligeiramente agitada e analisada por FTIR-ATR.

Relativamente, à BSA (barras azuis e laranjas) os rácios não sofreram alterações muito significativas com a variação das condições a que se sujeitou a proteína. No entanto, nos ensaios realizados com a BSA em contacto com o óleo (**Figura 4.27 a**), barras laranjas, BSA+OA 0 h e BSA+OA 72 h) observou-se uma ligeira diminuição do rácio $1622/1651$ em comparação com o espectro da proteína na ausência de óleo (BSA+A 0 h e BSA+A 72 h, respetivamente) o que se pode dever à alteração da

estrutura secundária da proteína quando em contacto com o óleo, o que pode sugerir um aumento da contribuição das hélices- α em detrimento das folhas- β , podendo também dever-se apenas à presença do óleo da mistura, como referido anteriormente. Este tipo de comportamento não foi observado quando a BSA esteve em contacto com os compostos voláteis do óleo (**Figura 4.27 b**), barras laranjas, BSA+VT 24 h e BSA+VT 72 h) não ocorrendo variação do rácio 1622/1651 relativamente aos ensaios apenas com proteína (**Figura 4.27 b**), barras azuis, BSA+T 24 h e BSA+T 72 h).

A proteína Lys em alguns casos sofreu maior variação no conteúdo dos seus elementos de estrutura secundária. Nos ensaios realizados com a Lys em contacto com o óleo (**Figura 4.27 a**), barras amarelas, Lys+OA 0 h e Lys+OA 72 h), observou-se uma diminuição mais evidente do rácio 1622/1651 em comparação com o espectro da proteína na ausência de óleo (**Figura 4.27 a**), barras cinza, Lys+A 0 h e Lys+OA 72 h) o que se pode dever à alteração da estrutura secundária da proteína em contacto com o óleo, o que pode significar que existe uma mais evidente alteração conformacional nos elementos de estrutura secundária da Lys quando em contacto com o óleo. No entanto, observando o tempo $t = 0$ h e o $t = 72$ h, não existe uma alteração significativa entre ambos.

Como referido anteriormente, a presença do óleo na solução pode ser a razão desta alteração estrutural, por isso, seria interessante, no futuro conseguir fazer as mesmas medições, conseguindo separar totalmente o óleo da solução proteica. Assim seria possível confirmar se de facto existem alterações na estrutura secundária das proteínas ou se estas alterações provêm apenas da alteração do ambiente hidrofóbico do solvente devido à presença do óleo.

Nos ensaios onde a BSA é colocada em contacto com os voláteis (BSA+VT 24 h e BSA+VT 72 h), é notório que não existe diferença significativa, tanto comparando com os controlos (BSA+T 24 h e BSA+T 72 h, respetivamente) bem como com o rácio da BSA com a sua conformação nativa (C_B).

Quanto aos ensaios feitos com a Lys apenas com os voláteis (**Figura 4.27 b**), barras amarelas, Lys+VT 24 h e Lys+VT 72 h), observou-se que a $t = 24$ h, os rácios para a Lys+T 24 h e Lys+VT 24 h são idênticos quando comparados com o rácio da proteína na sua estrutura nativa (C_L), sugerindo que neste caso a proteína não sofreu alterações conformacionais na presença dos compostos voláteis do óleo. Já no ponto a $t = 72$ h, a Lys em contacto com os voláteis (Lys+VT 72 h) tem um rácio idêntico ao controlo (C_L), ao contrário da amostra Lys+T 72 h em que se verifica uma grande diminuição do valor do rácio, neste caso parecendo indicar que existe a perda de estrutura secundária. Esta alteração do rácio pode dever-se à temperatura (37°C) a que a Lys se encontra durante as 72 h.¹⁰⁹ Posto isto, é de verificar que os compostos voláteis do óleo de *Nigella sativa*, parecem prevenir a Lys de sofrer alterações estruturais que se constata existirem na proteína Lys em solução.

A inibição da agregação da Lys pelo óleo é uma forma de inibir a formação de amiloides. Visto que os voláteis do óleo parecem prevenir alterações estruturais da Lys, pode inibir alguma da agregação desta e assim, impedir a formação de amiloides.^{104,109}

A doença de Alzheimer é o tipo de amiloidose mais frequente, é possível que o óleo com voláteis seja uma opção no combate e prevenção à AD, uma vez que pode ter atividade por duas vias diferentes, através da inibição da atividade da AChE e da prevenção de alterações estruturais que podem levar à formação de amiloides.¹¹⁰

5 Conclusões e Perspetivas Futuras

5.1 Conclusões

O óleo de sementes de *Nigella sativa* é utilizado há muito tempo de forma terapêutica, para além do seu uso gastronómico, mais recentemente tem vindo a ser referenciado com muitas atividades biológicas, incluindo, e talvez a mais interessante, seja a sua capacidade anticancerígena.

As capacidades biológicas testadas, como a atividade oxidante, bem como a inibição de enzimas como a AChE e a HMGCR, veio reforçar que, tal como descrito na literatura, o óleo de *Nigella sativa* pode ser útil na prevenção do stresse oxidativo, bem como na doença de Alzheimer e ainda na ajuda da prevenção dos altos níveis de colesterol. Pode ainda ser uma possível ajuda a combater o cancro. Todas estas atividades, que foram relatadas como associadas a este óleo, foram comprovadas neste trabalho para o óleo completo, ou seja, óleo com voláteis, sendo ainda, feito o estudo da capacidade anticancerígena do óleo de *N. sativa* contra as células do melanoma (A375).

Foi possível remover os compostos mais voláteis do óleo, e identificar quais foram, isto permitiu perceber se, tal como previsto pelo trabalho preliminar, os voláteis contribuem efetivamente para as atividades biológicas enunciadas para o óleo. No estudo ao óleo sem voláteis, a única capacidade que se manteve quase inalterada após a remoção dos voláteis foi a atividade antioxidante. No caso do estudo pelo método do DPPH, o óleo sem voláteis apresentou uma ligeira perda de atividade, já o método dos TBARS apresentou um aumento. Este aumento pode significar que muita da atividade da inibição da peroxidação lipídica poderá ser devida a compostos que não são eliminados da matriz do óleo.

Quanto aos ensaios de inibição de enzimas os estudos revelaram que quando retirados os voláteis ao óleo as suas capacidades inibitórias decresciam. A atividade anticancerígena reduziu drasticamente contra as linhas celulares MCF-7 e A375 constatando-se que o óleo com voláteis tem um elevado potencial anticancerígeno a concentrações baixas sendo mais eficaz contra a linha celular A375, no entanto quando removidos os voláteis, apresentou uma atividade citotóxica muito baixa para o caso das células do melanoma e ainda uma capacidade de aumentar o número de células para as células do cancro da mama.

A atividade anticancerígena, bem como a antioxidante é associada muitas vezes à presença de timoquinona no óleo, e esta é apenas ligeiramente removida da matriz do óleo quando se retiram os voláteis, o que explica os valores de EC₅₀ nas capacidades antioxidantes não serem muito alterados, no entanto, este trabalho demonstrou claramente que a diminuição da maioria das bioatividades estudadas será possivelmente devida aos compostos voláteis que são removidos.

Neste trabalho foram também identificados os compostos que possivelmente seriam responsáveis pelas atividades: timoquinona (ID 8) responsável pela atividade antioxidante, timol (ID 9) pela inibição da peroxidação lipídica, α -pineno (ID 2) pela inibição da atividade da AChE e o cimeno (ID 5) pela atividade anticancerígena.

Este trabalho demonstrou ainda claramente também que o óleo altera o perfil proteico das células (A375) uma vez que aparecem duas bandas na eletroforese o que indica que há o aumento da produção de pelo menos duas proteínas quando o óleo está em contacto com as células, a POTE anquirina, membro da família de domínio F e a HSP 90- β , ambas relacionadas com a apoptose e o stresse celular. Relativamente ao efeito que o óleo poderá ter sobre a estrutura de proteínas de importância fisiológica constatou-se, utilizando a Lys como modelo, que o óleo poderá ter um papel protetor sobre alterações estruturais de proteínas amiloides frequentemente associadas às doenças neurodegenerativas.

Em suma o trabalho apresentado afirma o grande potencial a nível biológico do óleo e as indicações etnofarmacológicas que lhe são associadas. Ficou, no entanto, evidente que poderá perder muitas capacidades caso sejam removidos os seus compostos voláteis.

5.2 Perspetivas Futuras

Com todas estas capacidades confirmadas, seria interessante fazer um estudo à inibição da peroxidação lipídica de uma forma diferente, utilizando uma fonte de lípidos mais homogénea e que facilitasse a realização do método para que se pudesse confirmar se efetivamente o óleo sem voláteis tem uma maior atividade. Quanto à capacidade antioxidante, o óleo apenas foi testado em termos da captação de radicais, portanto utilizar, seria interessante verificar se o óleo inibe o processo oxidativo, enzimaticamente, utilizando, por exemplo um *kit* de atividade da SOD.

Com o estudo preliminar da inibição da atividade da HMGCR, foi possível verificar que existe atividade inibitória do óleo com voláteis, e que o/os composto/os responsável/eis pela atividade é/são o cimeno (ID 5), γ -terpineno (ID 6), hidrato de trans-sabineno (ID 7) e/ou a timoquinona (ID 8). Como tal seria interessante realizar ensaios mais aprofundados para verificar a atividade do óleo com e sem voláteis bem como destes compostos, para determinar se têm atividade inibitória da HMGCR.

A nível espetroscópico, a utilização de um equipamento mais sensível e os estudos serem feitos em soluções de água deuterada e ainda fazer alterações ao método de preparação de amostras podem dar mais informação sobre estrutura secundária da proteína, podendo assim verificar se quando em contacto com o óleo existe efetivamente uma alteração estrutural.

Quanto à citotoxicidade, seria interessante verificar se esta se mantém para mais linhas celulares, e ainda, para confirmar a atividade anticancerígena, seria importante fazer os mesmos testes de citotoxicidade em linhas celulares não cancerígenas.

6 Bibliografia

1. Gurib-fakim, A. Medicinal plants : Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **27**, 1–93 (2006).
2. Firenzuoli, F. & Gori, L. Herbal Medicine Today: Clinical and Research Issues. *Evid. Based. Complement. Alternat. Med.* **4**, 37–40 (2007).
3. Petrovska, B. Historical review of medicinal plants’ usage. *Pharmacogn. Rev.* **6**, 1–5 (2012).
4. Hadi, M. Y., Mohammed, G. J. & Hameed, I. H. Analysis of bioactive chemical compounds of *Nigella sativa* using gas chromatography-mass spectrometry. **8**, 8–24 (2016).
5. Malik, T., Hasan, S., Pervez, S., Fatima, T. & Heleem, D. *Nigella sativa* Oil Reduces Extrapyrimal Symptoms (EPS) - Like Behavior in Haloperidol-Treated Rats. *Neurochem. Res.* 1–13 (2016). doi:10.1007/s11064-016-2073-z
6. Shaaban, H. A. E., El-Ghorab, A. H. & Shibamoto, T. Bioactivity of essential oils and their volatile aroma components: Review. *J. Essent. Oil Res.* **24**, 203–212 (2012).
7. Gaysinsky, S. & Weiss, J. Aromatic and spice plants: Uses in food safety. *Stewart Post Harvest Rev* **4**, 1–9 (2007).
8. Zink, D. L. The impact of consumer demands and trends on food processing. *Emerg. Infect. Dis.* **3**, 467–469 (1997).
9. Singh, S., Sharma, B., Kanwar, S. S. & Kumar, A. Lead Phytochemicals for Anticancer Drug Development. *Front. Plant Sci.* **7**, 1667 (2016).
10. Kooti, W., Hasanzadeh-noohi, Z., Sharafi-ahvazi, N., Asadi-samani, M. & Ashtary-larky, D. Phytochemistry , pharmacology , and therapeutic uses of black seed (*Nigella sativa*). *Chin. J. Nat. Med.* **14**, 732–745 (2016).
11. Ahmad, A. *et al.* A review on therapeutic potential of *Nigella sativa* : A miracle herb. **3**, 337–352 (2013).
12. Takruri, H. R. H. & Dameh, M. A. F. Study of the Nutritional Value of Black Cumin Seeds (*Nigella sativa* L). **404**, 404–410 (1998).
13. Johnson-ajinwo, O. R. & Li, W. Stable Isotope Dilution Gas Chromatography – Mass Spectrometry for Quanti fi cation of Thymoquinone in Black Cumin Seed Oil. (2014).
14. Amin, B. & Hosseinzadeh, H. Black Cumin (*Nigella sativa*) and Its Active Constituent, Thymoquinone: An Overview on the Analgesic and Anti-inflammatory Effects. *Planta Med.* **82**, 8–16 (2016).
15. Forouzanfar, F., Fazly Bazzaz, B. S. & Hosseinzadeh, H. Black cumin (*Nigella sativa*) and its constituent (thymoquinone): A review on antimicrobial effects. *Iran. J. Basic Med. Sci.* **17**, 929–938 (2014).
16. Khader, M. & Eckl, P. M. Thymoquinone: An emerging natural drug with a wide range of medical applications. *Iran. J. Basic Med. Sci.* **17**, 950–957 (2014).
17. Abukhader, M. M. Thymoquinone in the clinical treatment of cancer: Fact or fiction? *Pharmacogn. Rev.* **7**, 117–120 (2013).

18. Attoub, S. *et al.* Thymoquinone as an anticancer agent: Evidence from inhibition of cancer cells viability and invasion in vitro and tumor growth in vivo. *Fundam. Clin. Pharmacol.* **27**, 557–569 (2013).
19. Warner, G. M. G. and S. O. F. and J. N. L. and C. F. van N. and C. M. S. and I. M. Delivery of phytochemical thymoquinone using molecular micelle modified poly(D, L lactide- co - glycolide) (PLGA) nanoparticles. *Nanotechnology* **21**, 285104 (2010).
20. Odeh, F., Ismail, S. I., Abu-Dahab, R., Mahmoud, I. S. & Al Bawab, A. Thymoquinone in liposomes: a study of loading efficiency and biological activity towards breast cancer. *Drug Deliv.* **19**, 371–377 (2012).
21. Al-Amri, A. M. & Bamosa, A. O. Phase I Safety and Clinical Activity Study of Thymoquinone in Pa- tients with Advanced Refractory Malignant Disease. *Shiraz E Med. J. God Shiraz E-Medical J. Shiraz E Med. J.* **10**, 107–111 (2009).
22. Burits, M. & Bucar, F. Antioxidant activity of Nigella sativa essential oil. *Phyther. Res.* **14**, 323–328 (2000).
23. Khan, M. A., Chen, H. C., Tania, M. & Zhang, D. Z. Anticancer activities of Nigella sativa (Black Cumin). *African J. Tradit. Complement. Altern. Med.* **8**, 226–232 (2011).
24. Ahmad, S. & H. Beg, Z. Elucidation of mechanisms of actions of thymoquinone-enriched methanolic and volatile oil extracts from Nigella sativa against cardiovascular risk parameters in experimental hyperlipidemia. *Lipids Health Dis.* **12**, 86 (2013).
25. Beheshti, F., Khazaei, M. & Hosseini, M. Neuropharmacological effects of Nigella sativa. *Avicenna J. Phytomedicine* **6**, 124–141 (2016).
26. Alenzi, F. Q. *et al.* Antioxidant Properties of Nigella sativa. *J Mol Genet Med J Mol Genet Med J Mol Genet Med* **7**, 1000077–77 (2013).
27. Mousavi, S. H., Tayarani-Najaran, Z., Asghari, M. & Sadeghnia, H. R. Protective effect of Nigella sativa extract and thymoquinone on serum/glucose deprivation-induced PC12 cells death. *Cell. Mol. Neurobiol.* **30**, 591–598 (2010).
28. Sen, N., Kar, Y. & Tekeli, Y. Antioxidant activities of black cumin (Nigella sativa L.) seeds cultivating in different regions of Turkey. *J. Food Biochem.* **34**, 105–119 (2010).
29. Bourgou, S., Pichette, A., Marzouk, B. & Legault, J. Antioxidant, anti-inflammatory, anticancer and antibacterial activities of extracts from Nigella sativa (black cumin) plant parts. *Journal of Food Biochemistry* **36**, (2012).
30. Metodiewa, D. & Końska, C. Reactive oxygen species and reactive nitrogen species: Relevance to cyto(neuro)toxic events and neurologic disorders. An overview. *Neurotox. Res.* **1**, 197–233 (1999).
31. Abdel-Kader, A.-K. M., El-Demellawy, M. A., Awadalla, E. A. & Mustafa, H. M. Nigella sativa oil as a protective agent for cisplatin mediated hepatotoxicity in rats. *Egypt. J. Exp. Biol.* **9**(2), 173–180 (2013).

32. Final Report on the Safety Assessment of BHT. *Int. J. Toxicol.* **21**, 19–94 (2002).
33. Brewer, M. S. Natural Antioxidants: Sources, Compounds, Mechanisms of Action, and Potential Applications. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **10**, 221–247 (2011).
34. Moure, A. *et al.* Natural antioxidants from residual sources. *Food Chem.* **72**, 145–171 (2001).
35. WHO. *Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. World Health Organization technical report series* **916**, (2003).
36. Sirtori, C. R. Pharmacology and mechanism of action of the new HMG-CoA reductase inhibitors. *Pharmacol Res* **22**, 555–63 (1990).
37. Istvan, E. S. Structural Mechanism for Statin Inhibition of HMG-CoA Reductase. *Science* (80-.). **292**, 1160–1164 (2001).
38. Mullen, P. J., Yu, R., Longo, J., Archer, M. C. & Penn, L. Z. The interplay between cell signalling and the mevalonate pathway in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **16**, 718–731 (2016).
39. Sahebkar, A., Beccuti, G., Simental-Mendía, L. E., Nobili, V. & Bo, S. Nigella sativa (black seed) effects on plasma lipid concentrations in humans: A systematic review and meta-analysis of randomized placebo-controlled trials. *Pharmacol. Res.* **106**, 37–50 (2016).
40. Hamzo Dahri, A., Muhammad Chandioli, A., Akbar Rahoo, A. & Ahmed Memon, R. *Effect of Nigella sativa (kalonji) on serum cholesterol of albino rats. Journal of Ayub Medical College, Abbottabad : JAMC* **17**, (2005).
41. Golomb, B. A. & Evans, M. A. Statin adverse effects : a review of the literature and evidence for a mitochondrial mechanism. *Am. J. Cardiovasc. Drugs* **8**, 373–418 (2008).
42. Anand, P. & Singh, B. A review on cholinesterase inhibitors for Alzheimer’s disease. *Arch. Pharm. Res.* **36**, 375–399 (2013).
43. Quinn, D. M. Acetylcholinesterase: enzyme structure, reaction dynamics, and virtual transition states. *Chem. Rev.* **87**, 955–979 (1987).
44. Downes, G. B. & Granato, M. Acetylcholinesterase function is dispensable for sensory neurite growth but is critical for neuromuscular synapse stability. *Dev. Biol.* **270**, 232–245 (2004).
45. Acetylcholine (ACh). (2014). Available at: <http://sites.psu.edu/rbo5016neurostudyblog/2014/02/26/acetylcholine-ach/>. (Accessed: 28th September 2017)
46. Hosseini, M. *et al.* Effects of the hydro-alcoholic extract of Nigella sativa on scopolamine-induced spatial memory impairment in rats and its possible mechanism. *Chin. J. Integr. Med.* **21**, 438–444 (2015).
47. Cacabelos, R. Donepezil in Alzheimer’s disease: From conventional trials to pharmacogenetics. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* **3**, 303–333 (2007).
48. Randhawa, M. A. & Alenazi, S. A. Neuropsychiatric Effects of Nigella sativa (Black Seed) – A Review. *Altern. Integr. Med.* **5**, 1–8 (2016).
49. Organization, W. H. WHO, Cancer. (2017). Available at:

- <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>. (Accessed: 20th July 2017)
50. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57–70 (2000).
 51. Cattley, R. C. & Radinsky, R. R. Cancer Therapeutics: Understanding the Mechanism of Action. *Toxicol. Pathol.* **32**, 116–121 (2004).
 52. Randhawa, M. A. & Alghamdi, M. S. Anticancer Activity of *Nigella sativa* (Black Seed) — A Review. *Am. J. Chin. Med.* **39**, 1075–1091 (2011).
 53. el-Aziz, M. a A. *et al.* The biochemical and morphological alterations following administration of melatonin, retinoic acid and *Nigella sativa* in mammary carcinoma: an animal model. *Int. J. Exp. Pathol.* **86**, 383–396 (2005).
 54. Effenberger, K., Breyer, S. & Schobert, R. Terpene conjugates of the *Nigella sativa* seed-oil constituent thymoquinone with enhanced efficacy in cancer cells. *Chem. Biodivers.* **7**, 129–139 (2010).
 55. Musa, D., Dilsiz, N., Gumushan, H., Ulakoglu, G. & Bitiren, M. Antitumor activity of an ethanol extract of *Nigella sativa* seeds. **596**, 735–740 (2004).
 56. Reddy, Y. P., Chandrasekhar, K. B. & Sadiq, M. J. A study of *Nigella sativa* induced growth inhibition of MCF and HepG2 cell lines: An anti-neoplastic study along with its mechanism of action. *Pharmacognosy Res.* **7**, 193–197 (2015).
 57. Farah, I. & A Begum, R. *Effect of Nigella sativa (N. Sativa L.) and oxidative stress on the survival pattern of MCF-7 breast cancer cells. Biomedical sciences instrumentation* **39**, (2003).
 58. Salomi, M. J., Nair, S. C. & Panikkar, K. R. Inhibitory effects of *Nigella sativa* and saffron (*crocus sativus*) on chemical carcinogenesis in mice. *Nutr. Cancer* **16**, 67–72 (1991).
 59. Comsa, S., Cîmpean, A. & Raica, M. The Story of MCF-7 Breast Cancer Cell Line: 40 years of Experience in Research. *Anticancer Res.* **35**, 3147–54 (2015).
 60. Jeffs, A. R. *et al.* A Gene Expression Signature of Invasive Potential in Metastatic Melanoma Cells. *PLoS One* **4**, e8461 (2009).
 61. Bayala, B. *et al.* Anticancer activity of essential oils and their chemical components - a review. *Am. J. Cancer Res.* **4**, 591–607 (2014).
 62. Ab-Rahim, S. *et al.* Comparisons between Pre- Chemotherapy and Post-Chemotherapy Serum of Metastatic Osteosarcoma Patients Reveals Potential Novel Biomarker Abstract. *Biochem. Mol. Biol. J.* **1**, 1–10 (2015).
 63. Ahmed, N. *et al.* Unique proteome signature of post-chemotherapy ovarian cancer ascites-derived tumor cells. *Sci. Rep.* **6**, 30061 (2016).
 64. Yang, T. A., Zzaman, W., Silvia, D., Nadiyah, W. & Abdullah, W. Physicochemical and Quality Characteristics of Cold and Hot Press of *Nigella sativa* L Seed Oil Using Screw Press. **10**, 36–45 (2014).
 65. Oktay, M., Gulcin, I. & Kufrevioglu, O. I. Determination of in vitro antioxidant activity of fennel (*Foeniculum vulgare*) seed extracts. *LWT - Food Sci. Technol.* **36**, 263–271 (2003).

66. Tepe, B., Daferera, D., Sokmen, A., Sokmen, M. & Polissiou, M. Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller (Lamiaceae). *Food Chem.* **90**, 333–340 (2005).
67. Brito, E. Atividades Biológicas de Várias Espécies de *Plectranthus* e Influência sobre a Estrutura de Proteínas. (Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, 2016).
68. Antolovich M, Prenzler PD, Patsalides E, McDonald S, R. K. Methods for testing antioxidant activity. *Analyst* **127**, 183–198 (2002).
69. Serralheiro, M. L. M. *et al.* Antioxidant and anti-acetylcholinesterase activity of commercially available medicinal infusions after in vitro gastrointestinal digestion. *J. Med. Plants Res.* **7**, 1370–1378 (2013).
70. Riss, T. L. *et al.* Cell Viability Assays. (2016). Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>. (Accessed: 26th September 2017)
71. Stoscheck, C. M. [6] Quantitation of protein. in *Guide to Protein Purification* (ed. Deutscher, M. P. B. T.-M. in E.) **182**, 50–68 (Academic Press, 1990).
72. LCGC, E. Troubleshooting GC Selectivity, Resolution, and Baseline Issues. *LCGC Europe* 478 (2013).
73. S, D., Sridhar, S. & Palanisami, E. *Chemical composition and antioxidant activities of black seed oil (Nigella sativa L.)*. *International Journal of Pharmaceutical Science and Research* **7**, (2016).
74. Malhotra, S. *Nigella*. in *Handbook of herbs and spices* 391–416 (Woodhead Publishing Limited, 2012).
75. Gerige, S. J., Kumar, M., Gerige, Y. & Rao, M. GC-MS Analysis of *Nigella sativa* Seeds and Antimicrobial Activity of its Volatile oil. **52**, 1189–1192 (2009).
76. Kumar, S. & Venkatachallam, T. Chemical composition of *Nigella sativa* L. seed extracts obtained by supercritical carbon dioxide. **47**, 598–605 (2010).
77. Nergiz, C. & Otles, S. Chemical composition of *Nigella sativa* L. seeds. *Food Chem.* **48**, 259–261 (1993).
78. Gharby, S. *et al.* Chemical investigation of *Nigella sativa* L. seed oil produced in Morocco. *J. Saudi Soc. Agric. Sci.* **14**, 172–177 (2015).
79. Toma, C. & Simu, G. M. Chemical composition of the tunisian *nigella sativa*. Note II. Profile on fatty oil. **61**, 454–458 (2013).
80. Abdel-Hameed, E.-S. S. *et al.* Chemical Composition of Volatile Components , Antimicrobial and Anticancer activity of n -hexane Extract and Essential Oil from *Trachyspermum ammi* L. Seeds. *Orient. J. Chem.* **30**, 1653–1662 (2014).
81. Hyldgaard, M., Mygind, T., Meyer, R. L. & Debabov, D. Essential oils in food preservation : mode of action , synergies , and interactions with food matrix components. *Front. Microbiol.* **3**, 1–24 (2012).

82. Viuda-Martos, M., Ruíz-Navajas, Y., Fernández-López, J. & Pérez-Álvarez, J. A. Chemical Composition of the Essential Oils Obtained From Some Spices Widely Used in Mediterranean Region. **54**, 921–926 (2007).
83. Bendaoud, H., Romdhane, M., Souchard, J. P., Cazaux, S. & Bouajila, J. Chemical Composition and Anticancer and Antioxidant Activities of Schinus Molle L. and Schinus Terebinthifolius Raddi Berries Essential Oils. *J. Food Sci.* **75**, 466–472 (2010).
84. Kasangana, P., Haddad, P. & Stevanovic, T. Study of Polyphenol Content and Antioxidant Capacity of Myrianthus Arboreus (Cecropiaceae) Root Bark Extracts. *Antioxidants* **4**, 410–426 (2015).
85. Luna, A., Lábaque, M. C., Zygadlo, J. A. & Marin, R. H. Effects of thymol and carvacrol feed supplementation on lipid oxidation in broiler meat. *Poult. Sci.* **89**, 366–370 (2010).
86. Chamanara, V., Shabanpour, B., Gorgin, S. & Khomeiri, M. An investigation on characteristics of rainbow trout coated using chitosan assisted with thyme essential oil. *Int. J. Biol. Macromol.* **50**, 540–544 (2012).
87. Hosseinzadeh, H., Parvardeh, S., Asl, M. N., Sadeghnia, H. R. & Ziaee, T. Effect of thymoquinone and Nigella sativa seeds oil on lipid peroxidation level during global cerebral ischemia-reperfusion injury in rat hippocampus. *Phytomedicine* **14**, 621–627 (2007).
88. Kanter, M. *et al.* Effects of Nigella sativa L. and Urtica dioica L. on Lipid Peroxidation, Antioxidant Enzyme Systems and Some Liver Enzymes in CCl₄-Treated Rats. *J. Vet. Med. Ser. A* **11**, 264–268 (2003).
89. Falé, P. L. *et al.* Evaluation of cholesterol absorption and biosynthesis by decoctions of Annona cherimola leaves. *J. Ethnopharmacol.* **150**, 718–723 (2013).
90. Kivrak, I. *et al.* Antioxidant, anticholinesterase and antimicrobial constituents from the essential oil and ethanol extract of Salvia potentillifolia. *Food Chem.* **116**, 470–479 (2009).
91. Silva, L. *et al.* Antiacetylcholinesterase activity and docking studies with chlorogenic acid, cynarin and arzanol from Helichrysum stoechas (Lamiaceae). *Med. Chem. Res.* (2017). doi:10.1007/s00044-017-1994-7
92. Sobral, M. V., Xavier, A. L., Lima, T. C. & de Sousa, D. P. Antitumor Activity of Monoterpenes Found in Essential Oils. *Sci. World J.* **2014**, 953451 (2014).
93. Nurestri, S. *et al.* Phytochemical and Cytotoxic Investigations of Alpinia mutica Rhizomes. *Molecules* **16**, 583–589 (2011).
94. Liu, X. F., Bera, T. K., Liu, L. J. & Pastan, I. A primate-specific POTE-actin fusion protein plays a role in apoptosis. *Apoptosis* **14**, 1237–1244 (2009).
95. Gourlay, C. W. & Ayscough, K. R. The actin cytoskeleton: a key regulator of apoptosis and ageing? *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 583–589 (2005).
96. Tang, H. L., Le, A.-H. P. & Lung, H. L. The increase in mitochondrial association with actin precedes Bax translocation in apoptosis. *Biochem. J.* **396**, 1–5 (2006).

97. Häcker, G. The morphology of apoptosis. *Cell Tissue Res.* **301**, 5–17 (2000).
98. Csermely, P., Schnaider, T., So"ti, C., Prohászka, Z. & Nardai, G. The 90-kDa Molecular Chaperone Family: Structure, Function, and Clinical Applications. A Comprehensive Review. *Pharmacol. Ther.* **79**, 129–168 (1998).
99. Bagatell, R. *et al.* Induction of a Heat Shock Factor 1-dependent Stress Response Alters the Cytotoxic Activity of Hsp90-binding Agents. *Clin. Cancer Res.* **6**, 3312 LP-3318 (2000).
100. Haris, P. I. & Severcan, F. FTIR spectroscopic characterization of protein structure in aqueous and non-aqueous media. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **7**, 207–221 (1999).
101. Pelton, J. T., Pelton, J. T., R., M. L. & R., M. L. Spectroscopic methods for analysis of protein secondary structure. *Anal. Biochem.* **277**, 167–176 (2000).
102. Kong, J. & Yu, S. Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*. **39**, 549–559 (2007).
103. Haris, P. & Chapman, D. Fourier Transform Infrared Spectroscopy of Biomembrane Systems. in *Infrared Spectroscopy of Biomolecules* (1996).
104. Swaminathan, R., Ravi, V. K., Kumar, S., Kumar, M. V. S. & Chandra, N. *Lysozyme: A model protein for amyloid research. Advances in Protein Chemistry and Structural Biology* **84**, (2011).
105. Stuart, B. H. Infrared Spectroscopy Of Biological Applications: An Overview. *Encycl. Anal. Chem.* 529–558 (2006). doi:10.1002/9780470027318.a0208.pub2
106. Manas, E. S., Getahun, Z., Wright, W. W., Degrado, W. F. & Vanderkooi, J. M. Infrared spectra of amide groups in α -helical proteins: Evidence for hydrogen bonding between helices and water. *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 9883–9890 (2000).
107. Litvinov, R. I., Faizullin, D. A., Zuev, Y. F. & Weisel, J. W. The α -helix to β -sheet transition in stretched and compressed hydrated fibrin clots. *Biophys. J.* **103**, 1020–1027 (2012).
108. Yang, H., Yang, S., Kong, J., Dong, A. & Yu, S. Obtaining information about protein secondary structures in aqueous solution using Fourier transform IR spectroscopy. *Nat. Protoc.* **10**, 382–96 (2015).
109. Sassi, P., Giugliarelli, A., Paolantoni, M., Morresi, A. & Onori, G. Unfolding and aggregation of lysozyme: A thermodynamic and kinetic study by FTIR spectroscopy. *Biophys. Chem.* **158**, 46–53 (2011).
110. Ghiso, J. & Frangione, B. Amyloidosis and Alzheimer's disease. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **54**, 1539–1551 (2002).

7 Anexos

Anexo A – Espectros de massa obtidos do pico 1 ao pico 14, utilizados para as respectivas identificações.

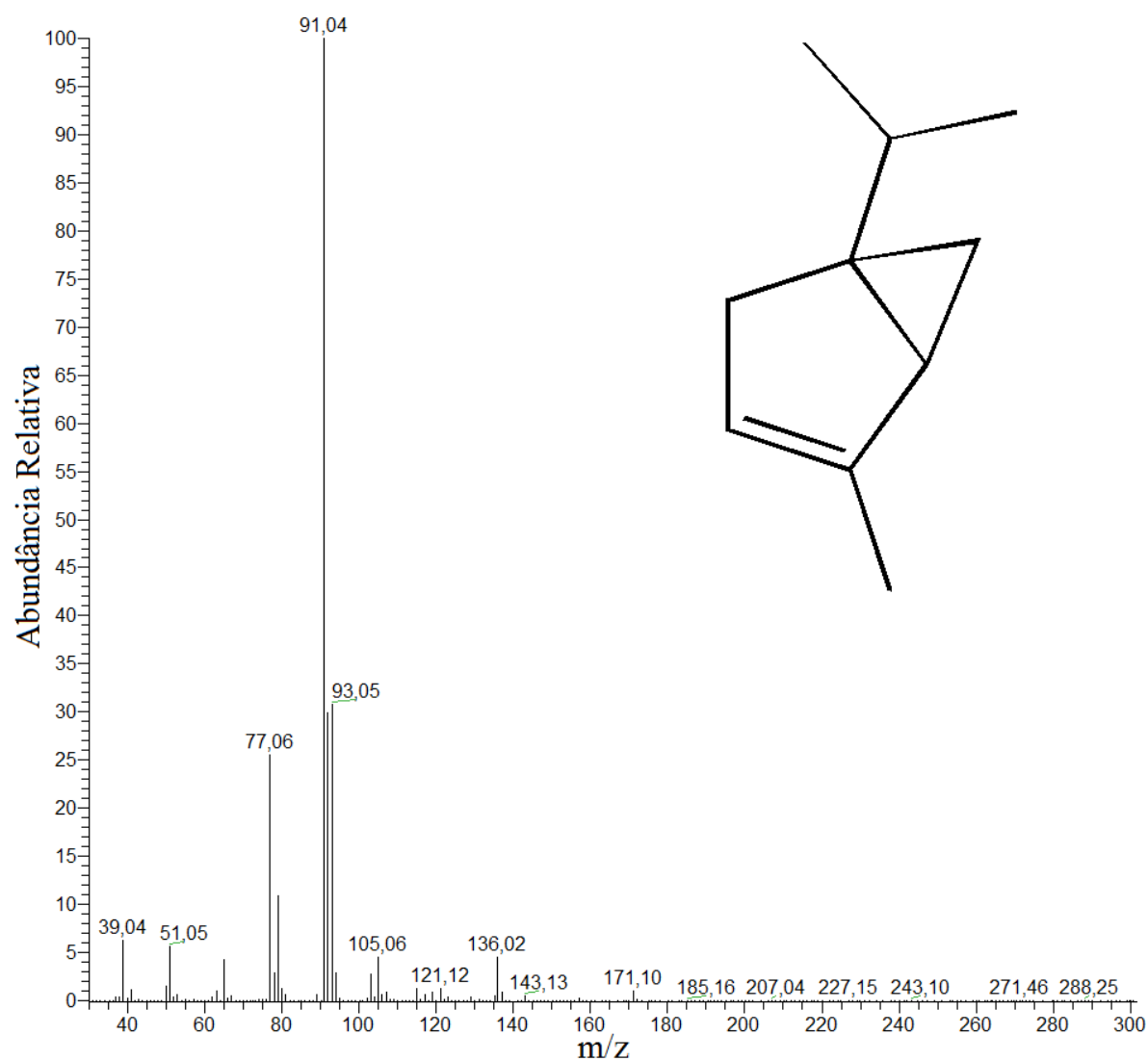


Figura 7.1 - α -tujeno (ID 1).

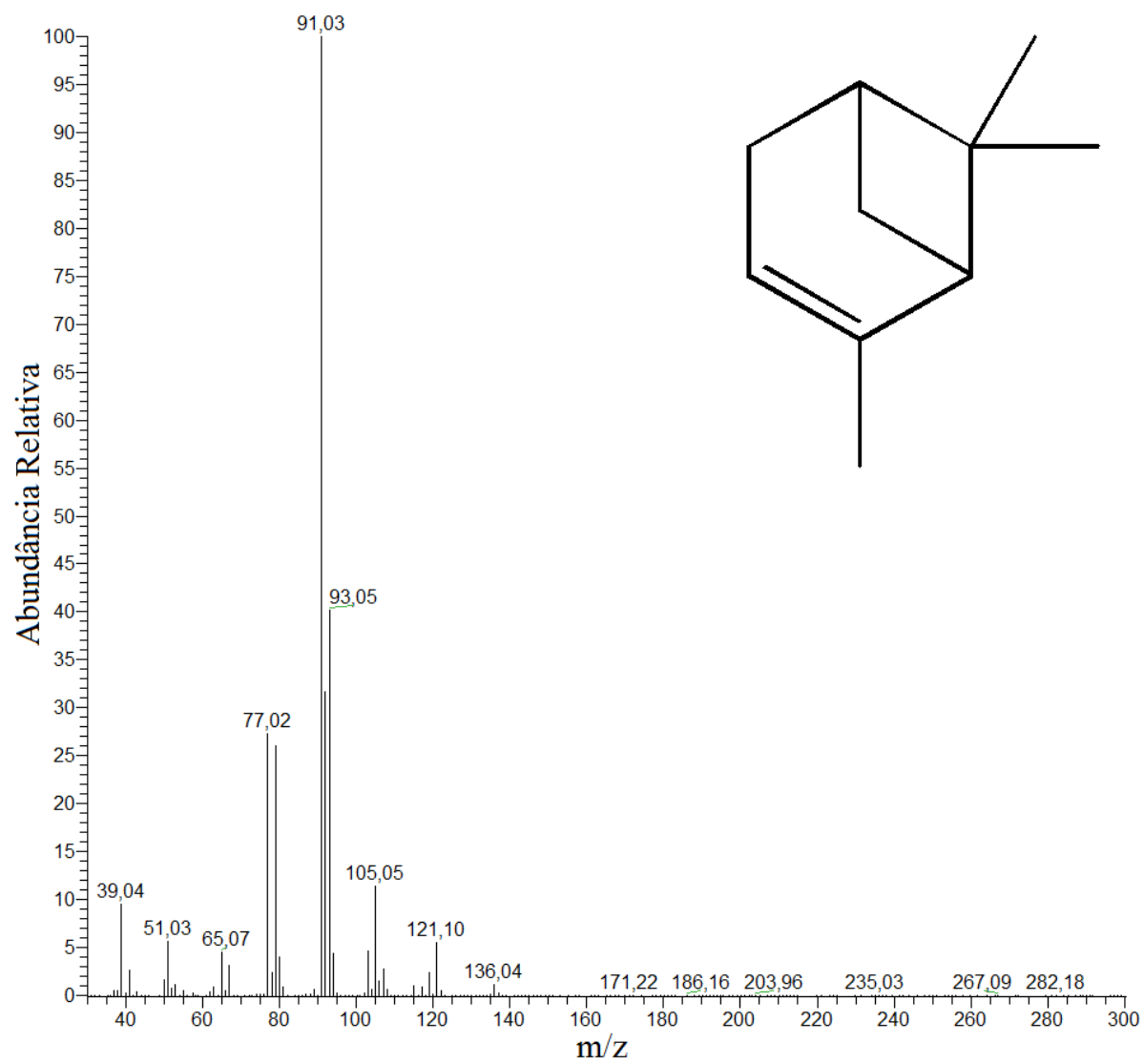


Figura 7.2 - α -pineno (ID 2).

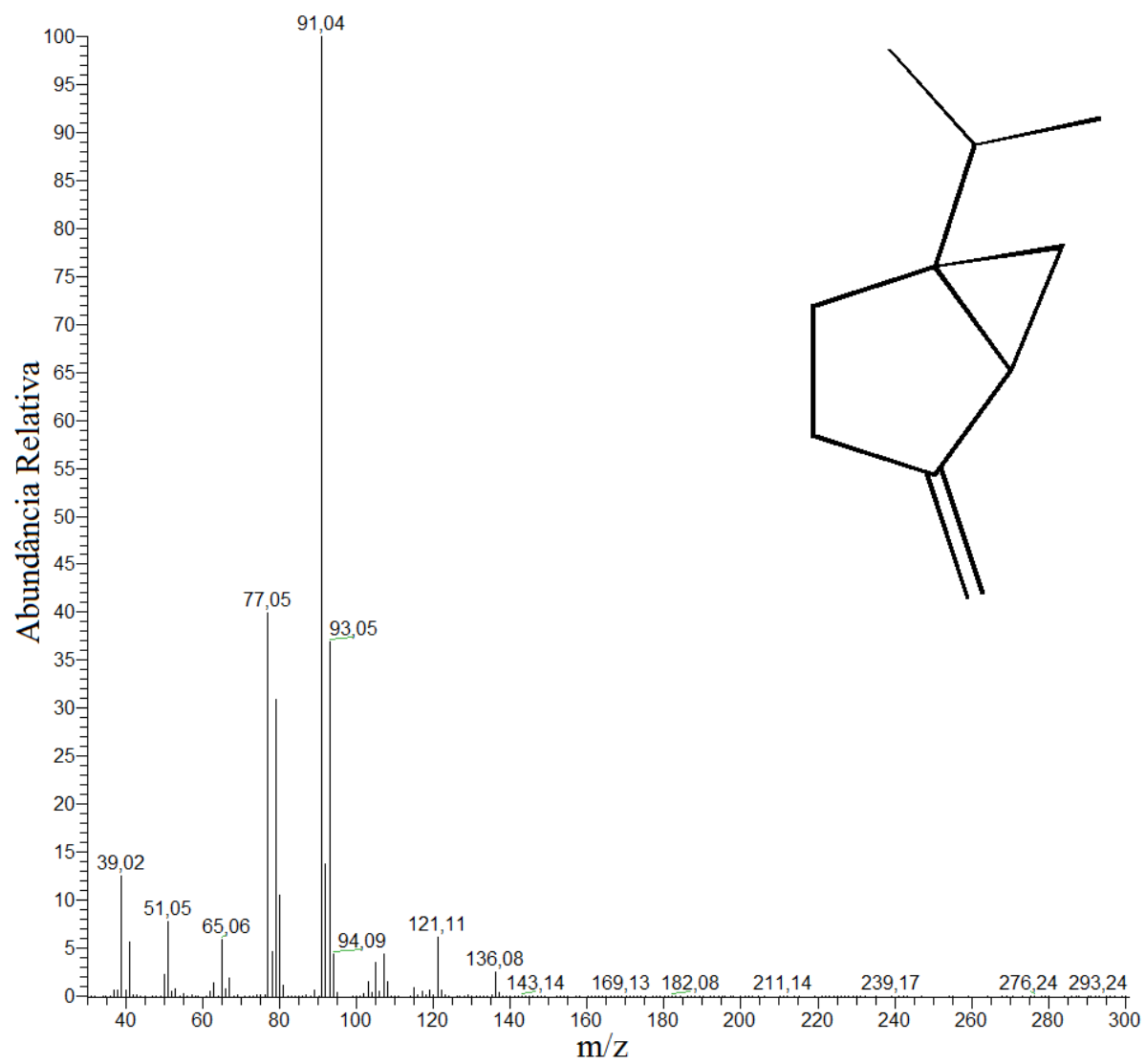


Figura 7.3 - sabineno (ID 3).

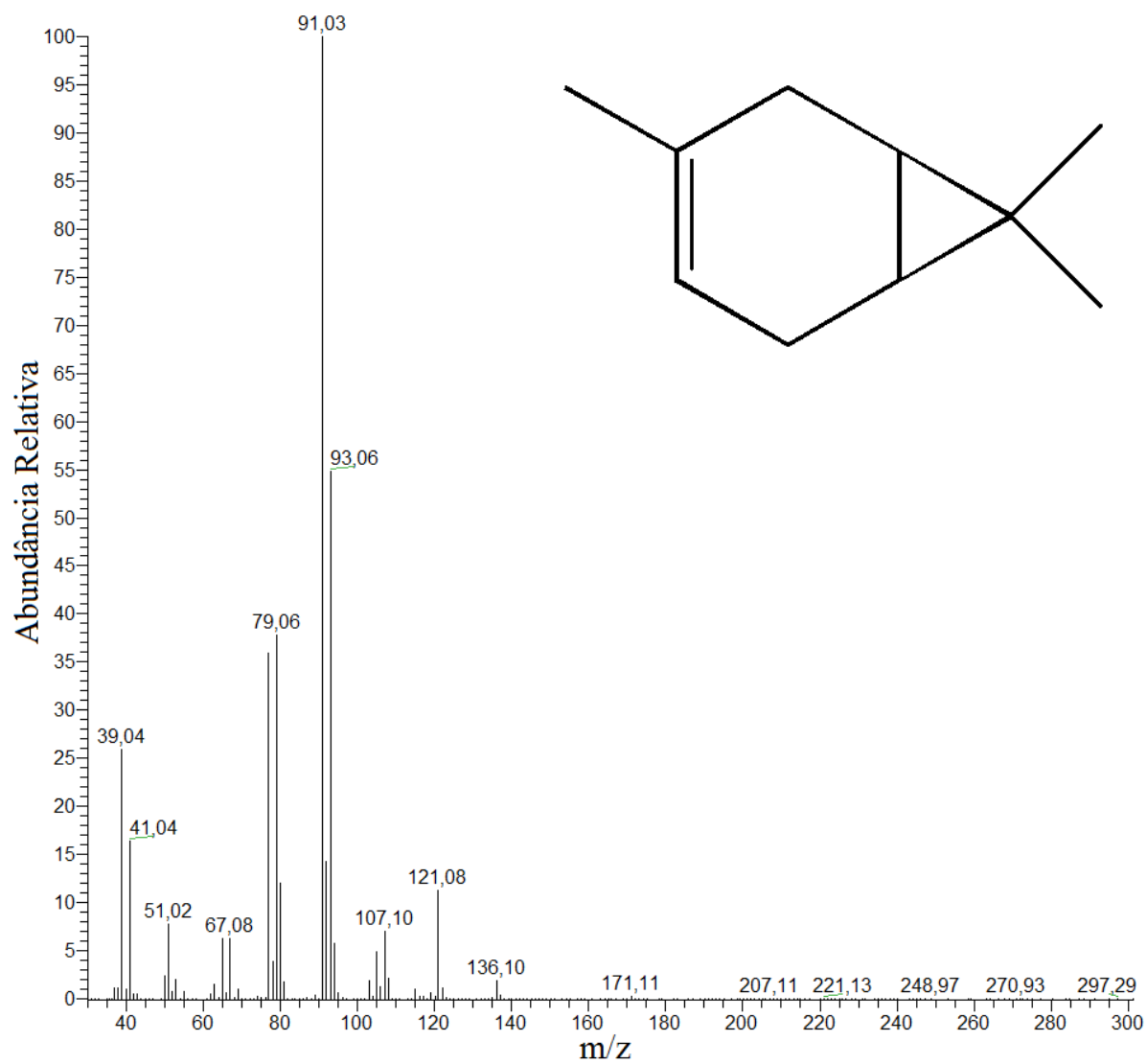


Figura 7.4 - 3-careno (ID 4).

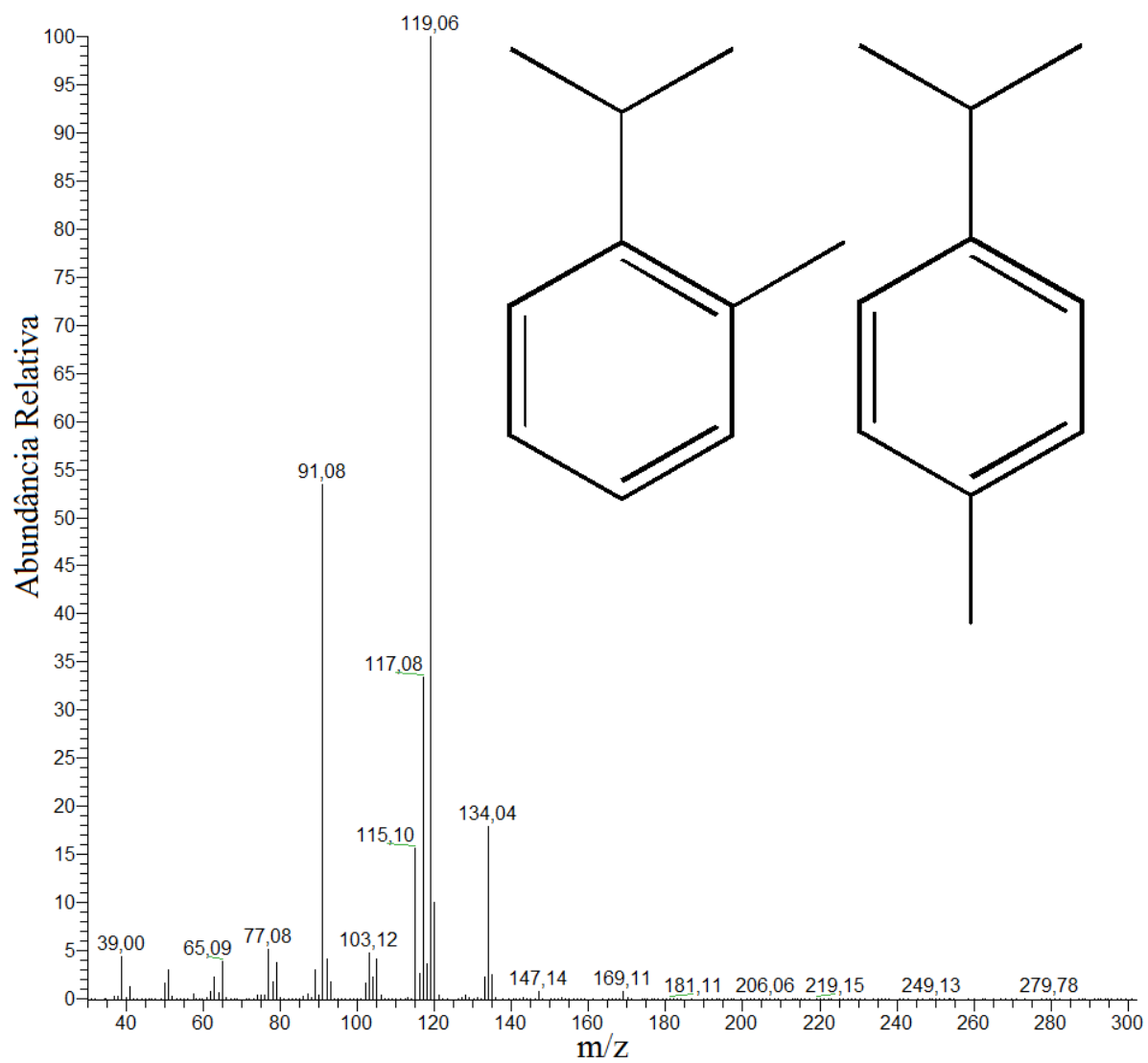


Figura 7.5 - cimeno (orto/para) (ID 5).

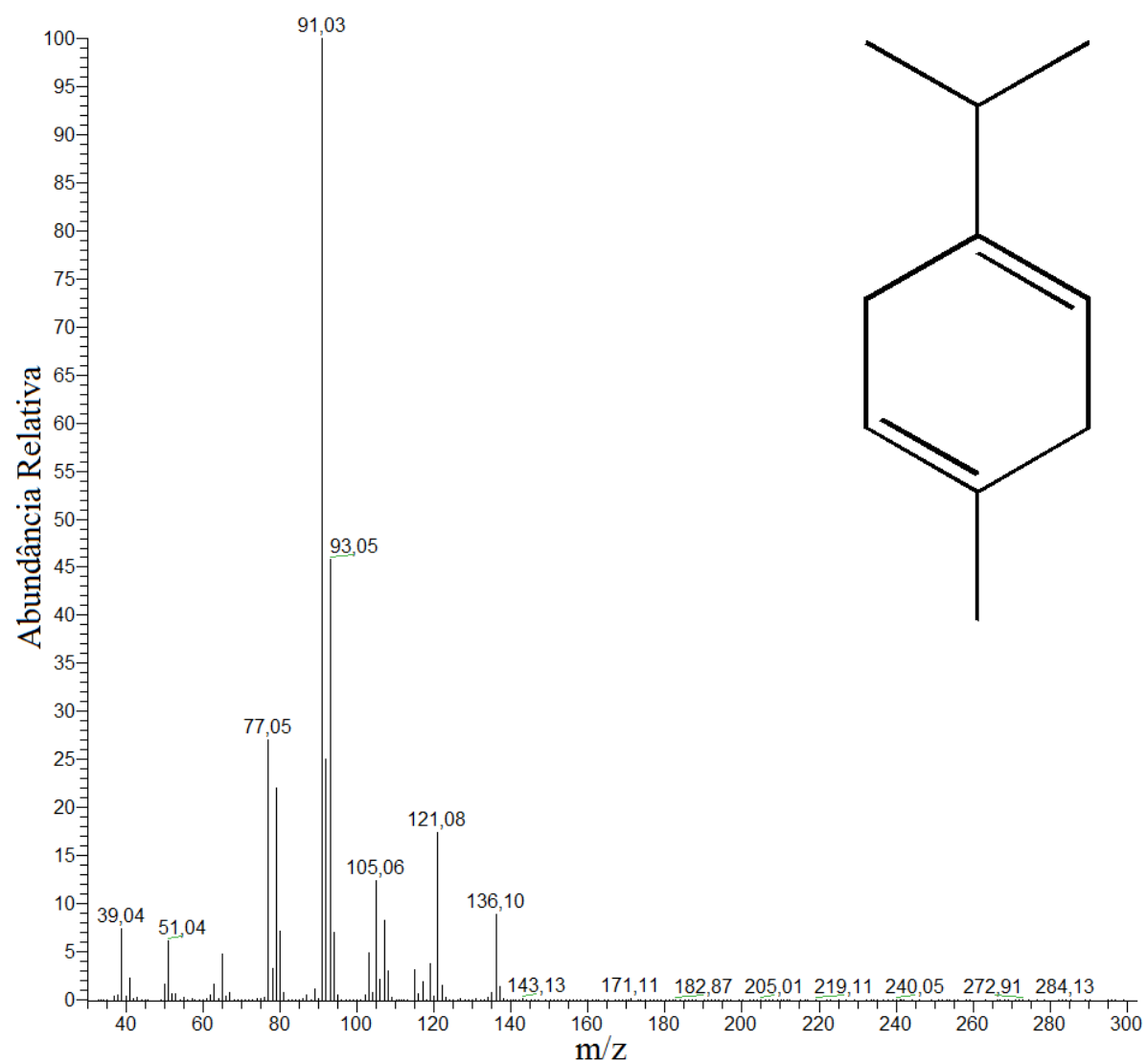


Figura 7.6 - γ -terpineno (ID 6).

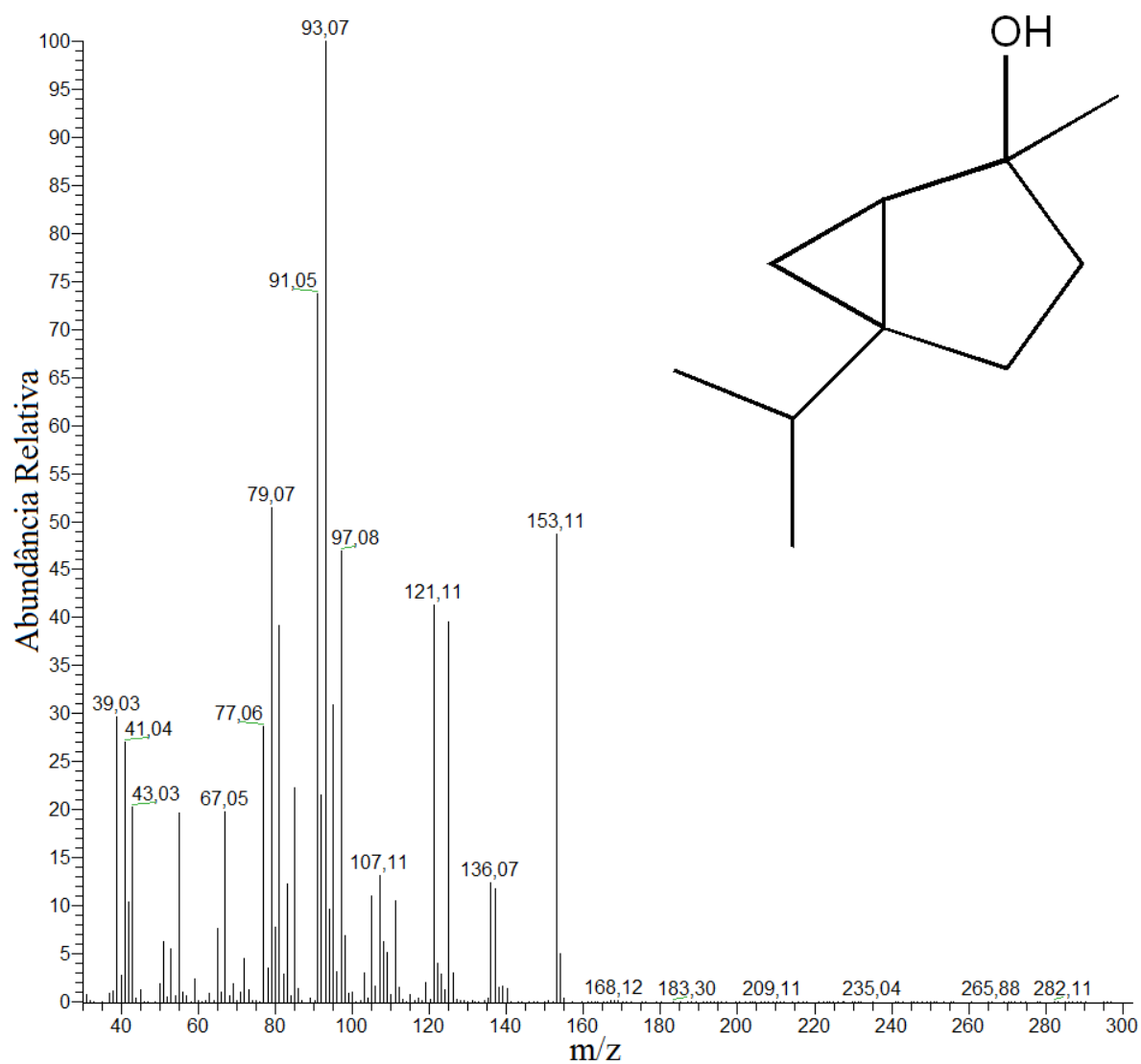


Figura 7.7 - hidrato de trans-sabineno (ID 7).

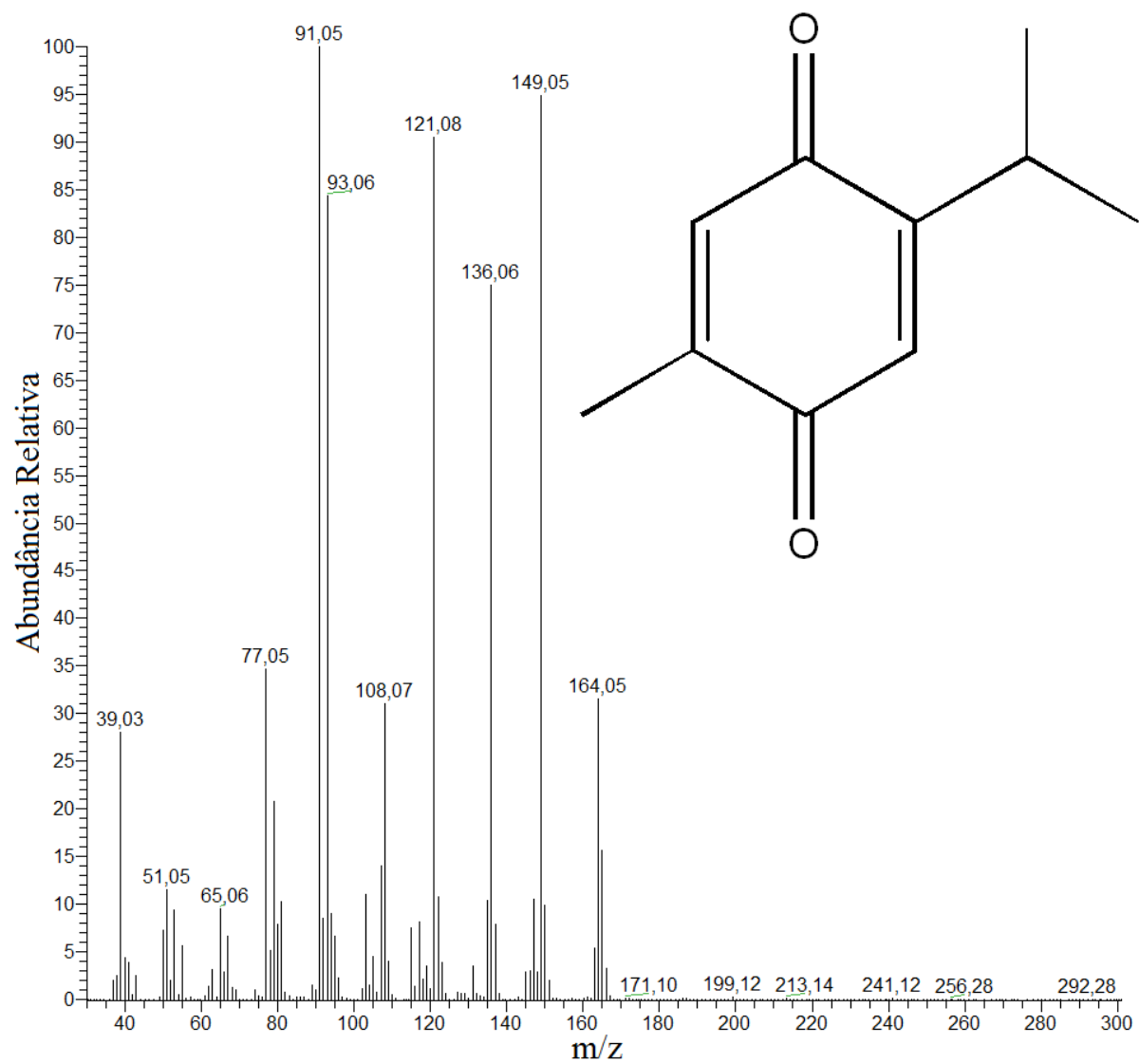


Figura 7.8 - timoquinona (ID 8).

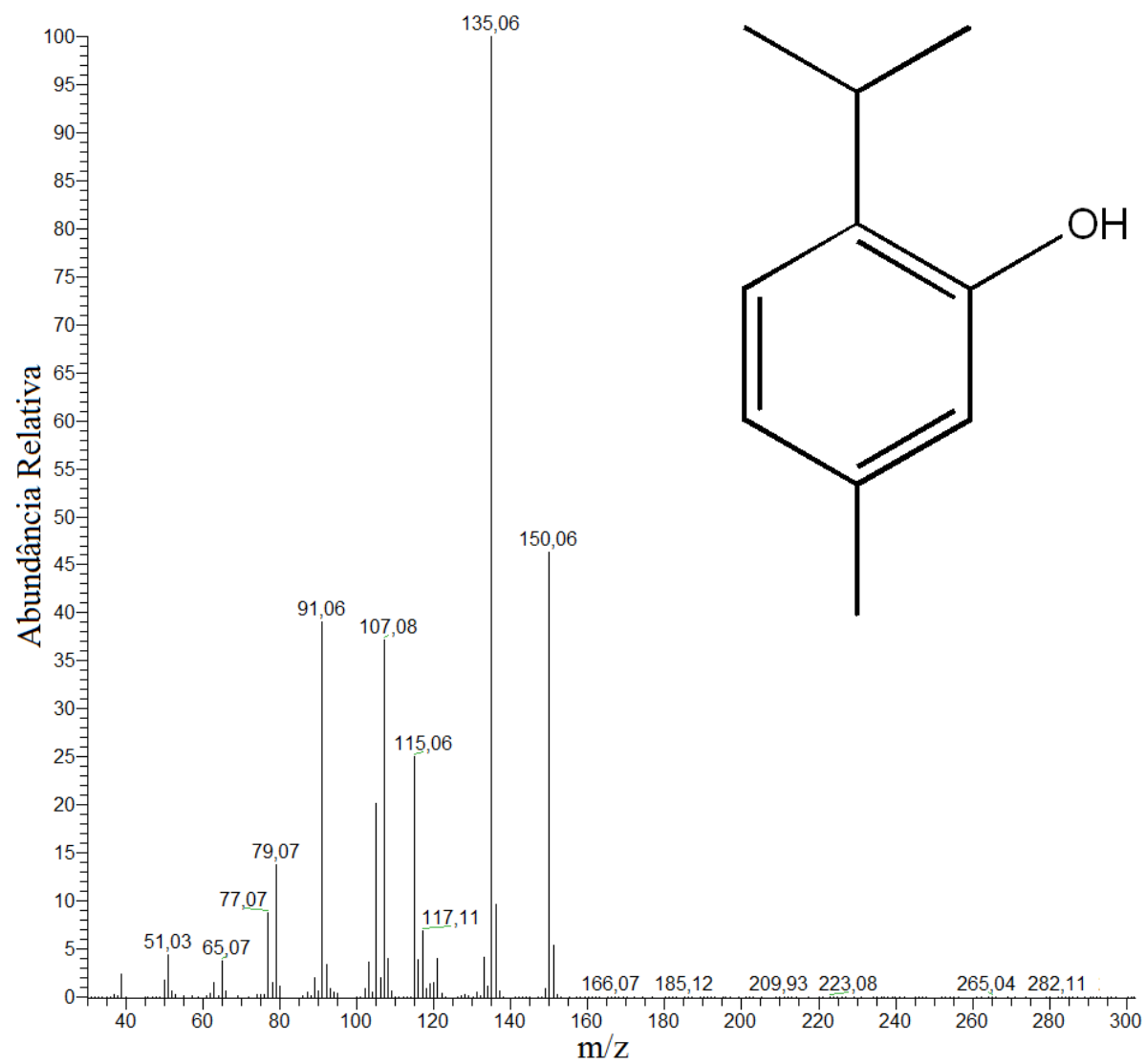


Figura 7.9 - timol (ID 9).

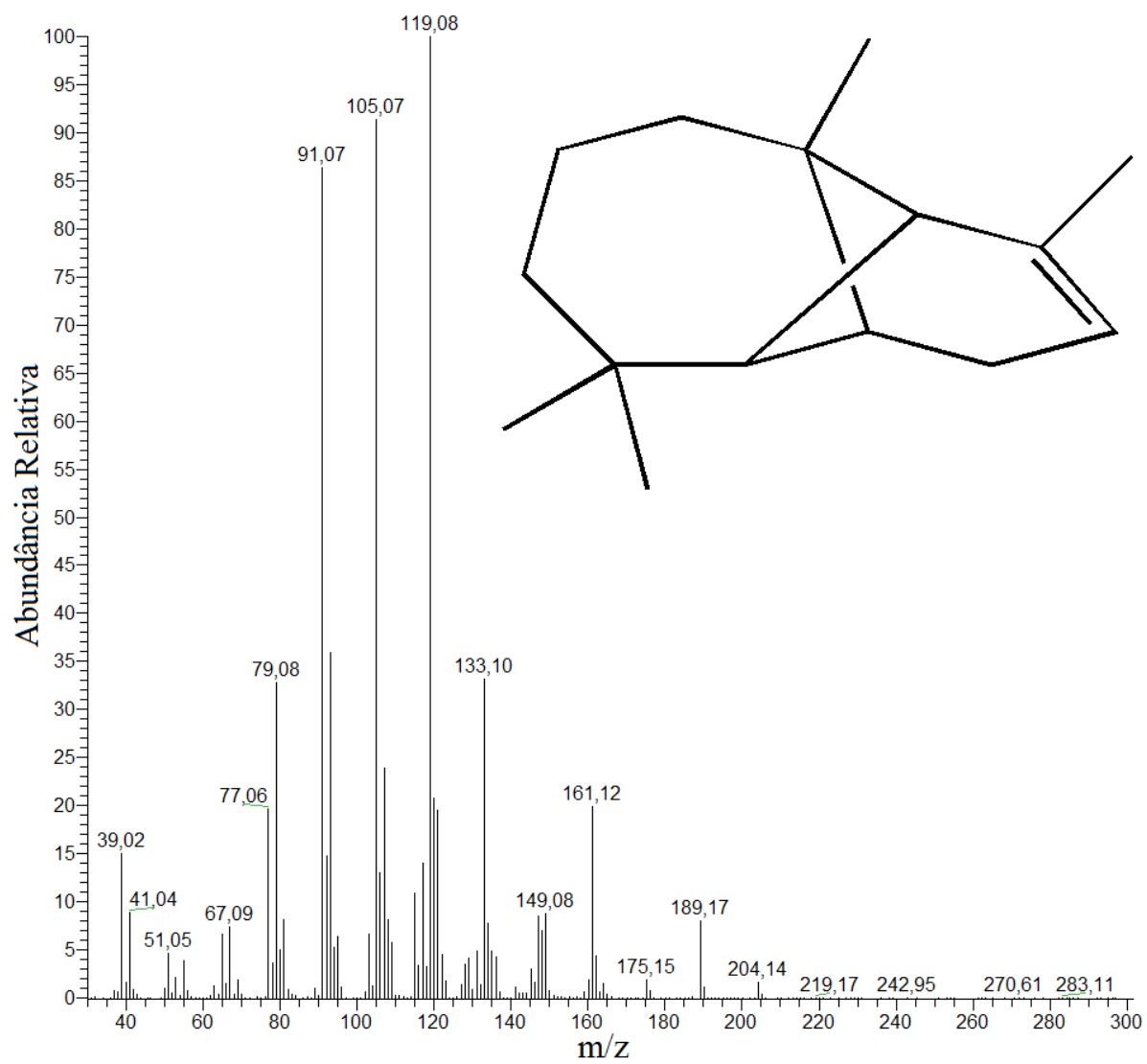


Figura 7.10 - α-longipineno (ID 10).

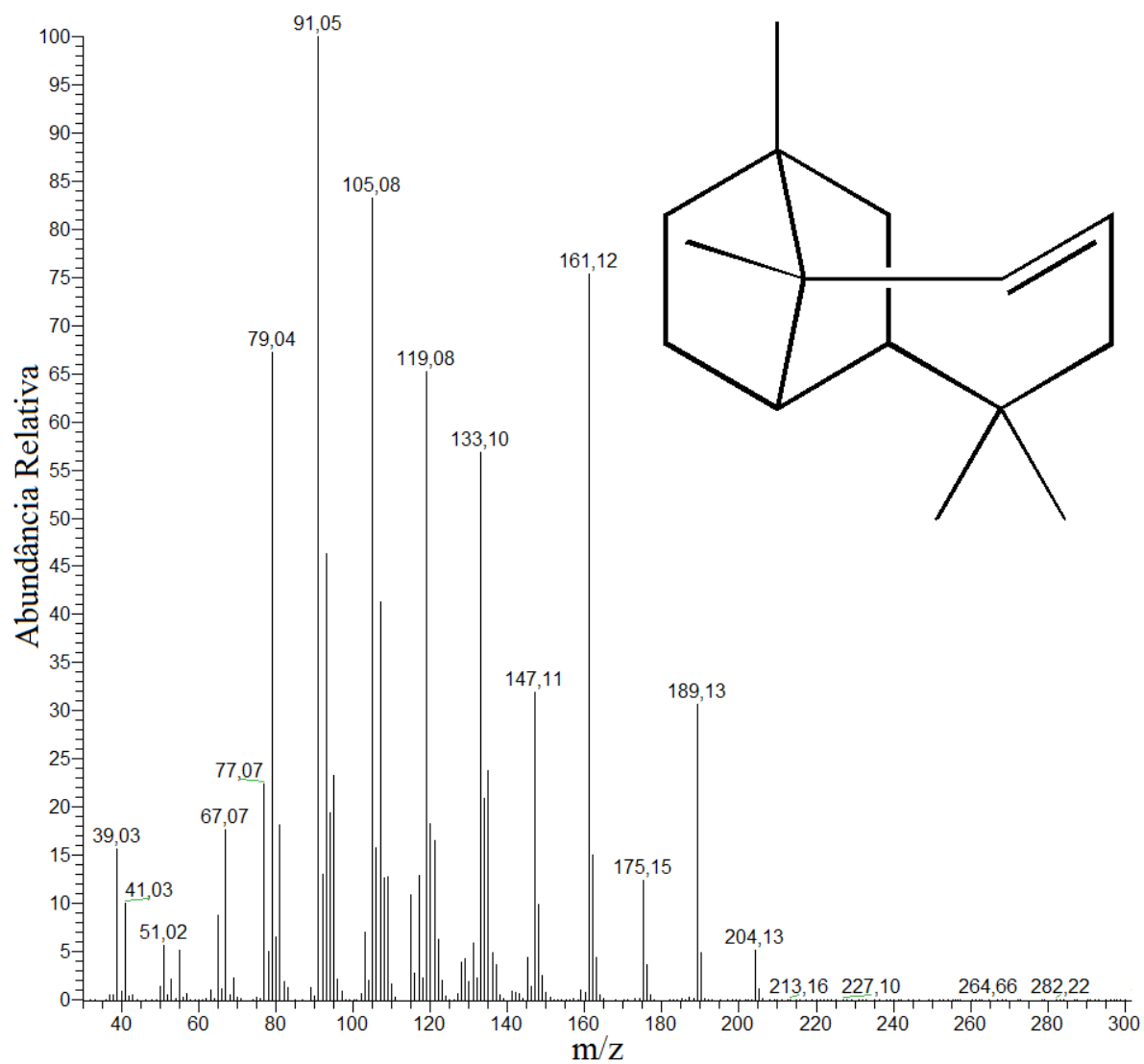


Figura 7.11 - longifoleno (ID 11).

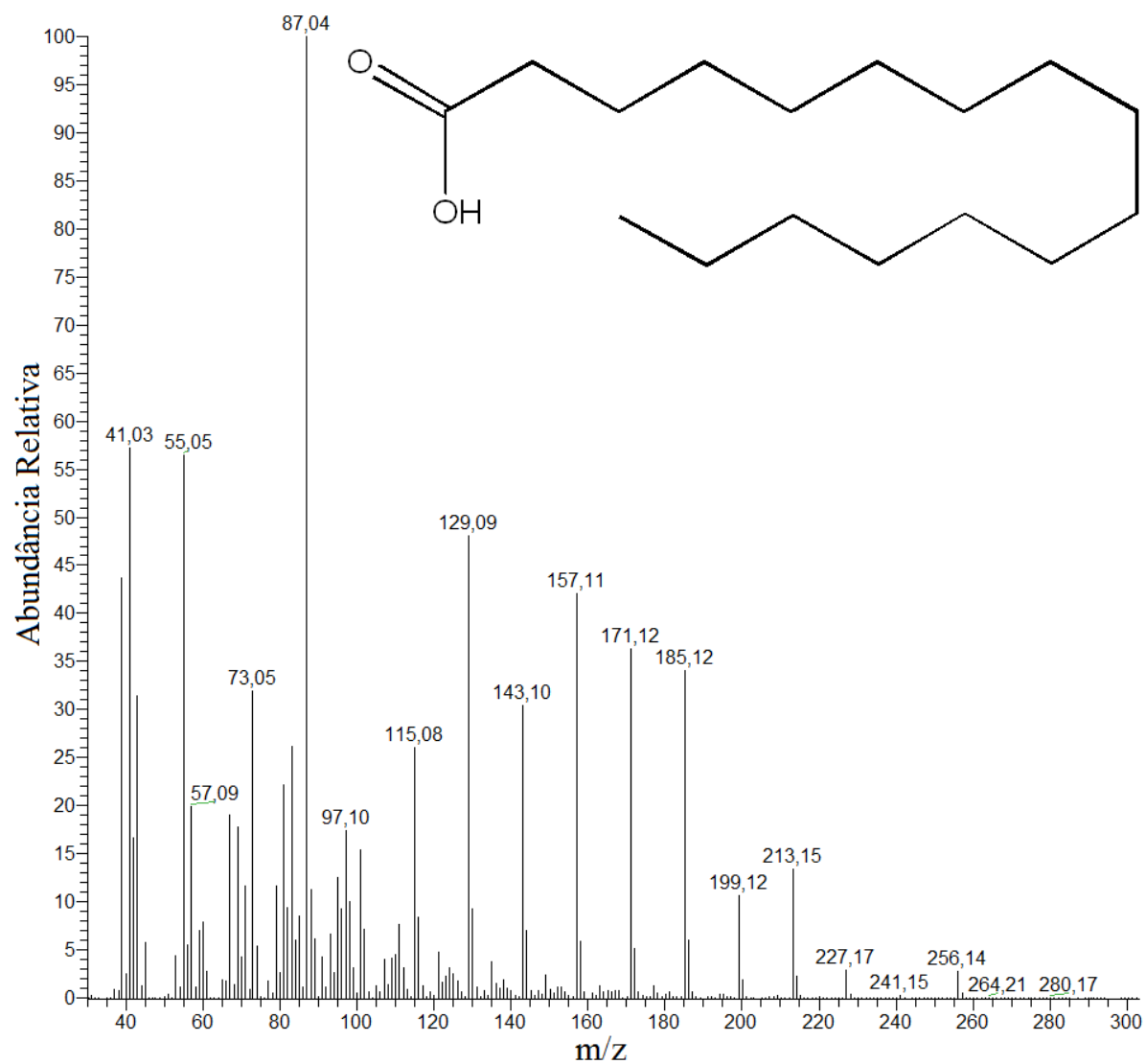


Figura 7.12 - ácido palmítico (ID 12).

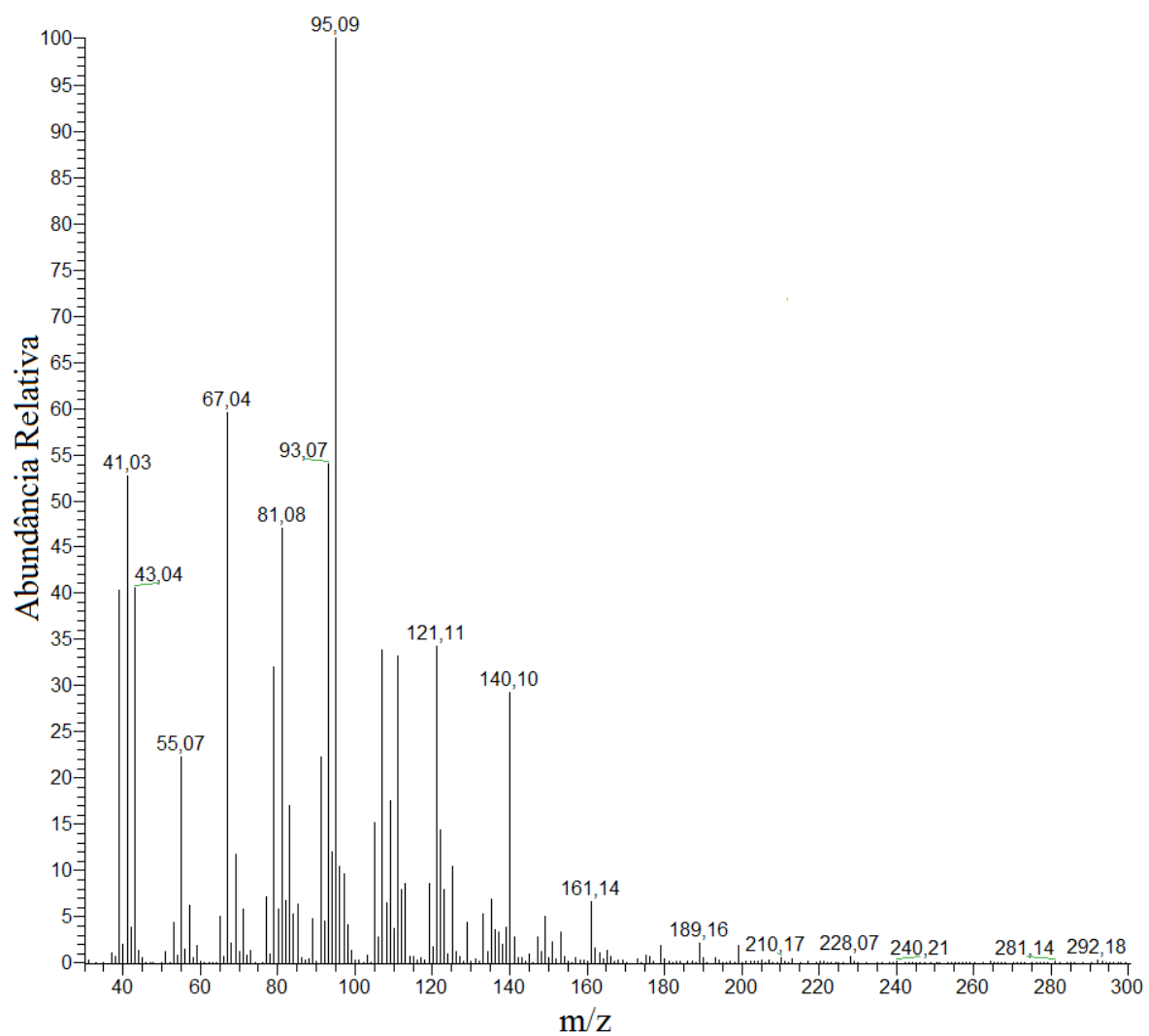


Figura 7.13 - Composto não identificado (n.i.) (ID 13).

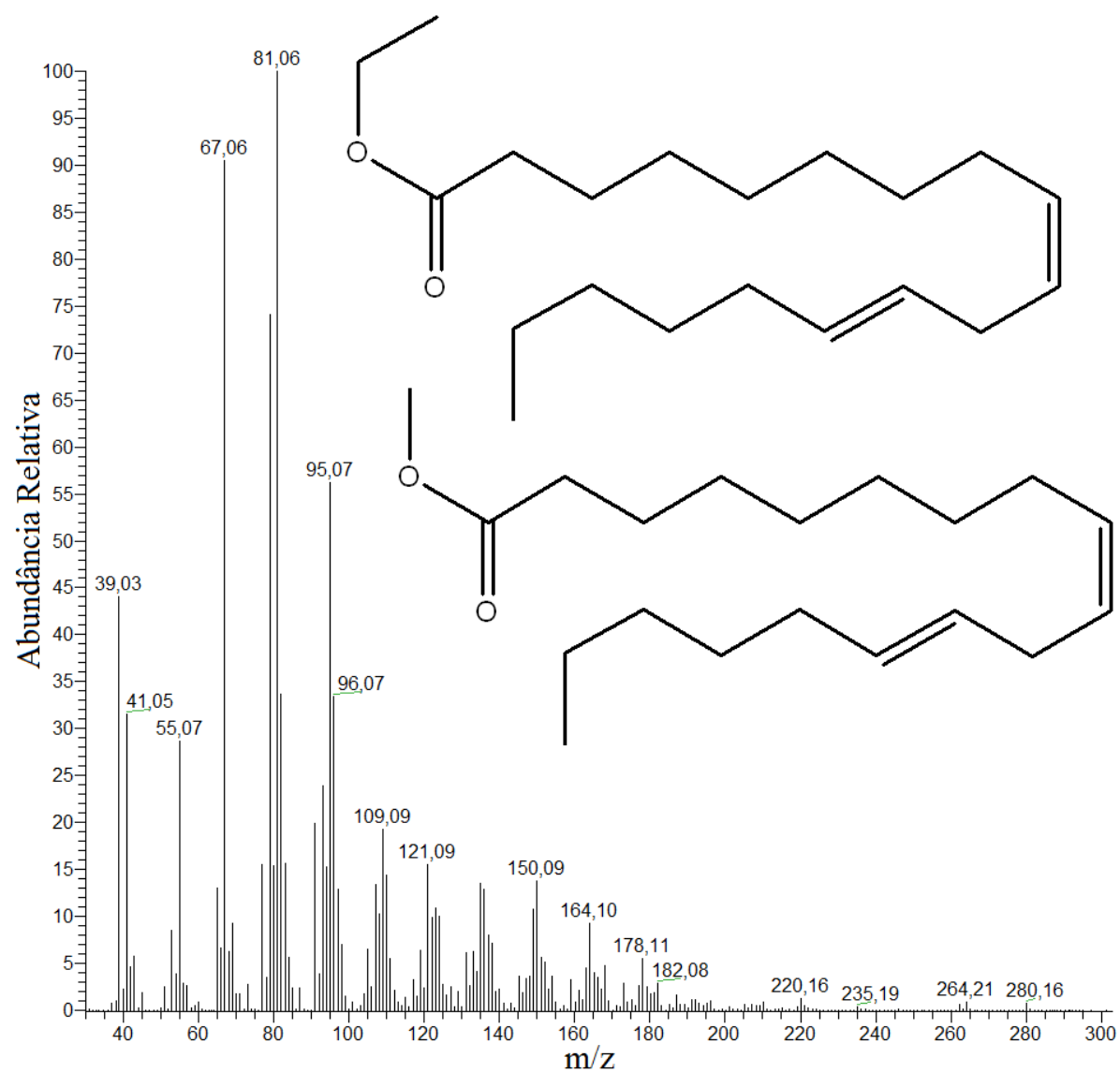


Figura 7.14 - etil linoleato e metil linoleato (ID 14).